



Grażyna Wilczek

**Komórkowe strategie
reakcji pająków
na stres środowiskowy**

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Katowice 2008

**Komórkowe strategie
reakcji pajaków
na stres środowiskowy**



NR 2638



Grażyna Wilczek

**Komórkowe strategie
reakcji pajaków
na stres środowiskowy**

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Katowice 2008

Redaktor serii: Biologia PAWEŁ MIGULA

Recenzenci ELŻBIETA PYZA
EUGENIA TĘGOWSKA

Publikacja jest dostępna także w wersji internetowej

Śląska Biblioteka Cyfrowa
www.sbc.org.pl

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	9
1. Wstęp	11
1.1. Wprowadzenie	11
1.2. Pająki wobec stresorów środowiskowych	12
1.2.1. Metale ciężkie	13
1.2.2. Pestycydy	15
1.2.3. Temperatura i głódzenie	16
1.3. Komórkowe reakcje na stres	18
1.3.1. Systemy antyoksydacyjne.	19
1.3.2. Apoptoza i nekroza jako biomarkery stresu	20
1.3.3. Białka szoku cieplnego (Hsp) oraz metalotioneiny (Mt) jako czynniki antyoksydacyjne i antyapoptotyczne	23
1.3.3.1. Białka szoku cieplnego (Hsp)	24
1.3.3.2. Metalotioneiny (Mt)	26
2. Cele pracy	28
3. Materiał i metody	30
3.1. Teren badań	30
3.2. Charakterystyka badanych gatunków pajaków	30
3.3. Grupy doświadczalne i stosowane czynniki stresowe	33
3.4. Charakterystyka gruczołów jelita środkowego pajaków	34
3.5. Analizy cytometryczne i spektrofotometryczne	36
3.5.1. Wskaźniki śmierci komórkowej i białka stresu	36
3.5.1.1. Przygotowanie materiału do analiz cytometrycznych	36
3.5.1.2. Ilościowa ocena komórek apoptotycznych i nekrotycznych	36
3.5.1.3. Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami	38
3.5.1.4. Ilościowa ocena komórek Mt pozytywnych	39
3.5.1.5. Ilościowa ocena komórek Hsp70 pozytywnych	40
3.5.1.6. Proteazy kaspazopodobne (Cas-3)	40
3.5.2. Wskaźniki antyoksydacyjne.	41
3.5.2.1. Glutation całkowity (GSH + GSSG)	42

3.5.2.2.	Peroksydazy glutationowe: selenozależna (GPOX; EC 1.11.1.9) i niezależna od selenu (GSTPx)	42
3.5.2.3.	S-transferaza glutationowa (GST; EC 2.5.11.18)	42
3.5.2.4.	Dysmutaza nadtlenkowa (SOD; EC 1.15.1.1)	43
3.5.2.5.	Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6)	43
3.6.	Oznaczanie stężenia białka	43
3.7.	Analizy statystyczne	44
3.8.	Odczynniki chemiczne	44
4.	Wyniki.	45
4.1.	Analiza czynnikowa udziału zastosowanych stresorów oraz płci i stanowiska w odpowiedziach komórkowych u pajaków	45
4.2.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Agelena labyrinthica</i>	49
4.2.1.	Szok termiczny	49
4.2.2.	Pestycyd	50
4.2.3.	Łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu	51
4.2.4.	Głodzenie	54
4.3.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Xerolycosa nemoralis</i>	54
4.3.1.	Szok termiczny	54
4.3.2.	Pestycyd	55
4.3.3.	Łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu	55
4.3.4.	Głodzenie	56
4.4.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Agelena labyrinthica</i>	59
4.4.1.	Szok termiczny	59
4.4.2.	Pestycyd	59
4.4.3.	Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu	60
4.4.4.	Głodzenie	60
4.5.	Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego pajaków <i>Xerolycosa nemoralis</i>	63
4.5.1.	Szok termiczny	63
4.5.2.	Pestycyd	63
4.5.3.	Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu	64
4.5.4.	Głodzenie	64
4.6.	Porównanie reakcji samic i samców na zastosowane czynniki stresogenne	67
5.	Dyskusja.	69
5.1.	Rodzaj czynnika stresowego a zmiany poziomu wskaźników śmierci komórkowej u pajaków	69
5.2.	Antyoksydacyjna obrona u pajaków w odpowiedzi na czynniki stresowe	74
5.3.	Reakcje samic i samców pajaków w odpowiedzi na stres	80
5.4.	Przedeksperymentalne wskaźniki stresu u zwierząt z terenów referencyjnych i silnie zanieczyszczonych	85

5.4.1.	Komórkowe reakcje samic i samców pajaków na dodatkowe czynniki stresogenne a wcześniejsza preekspozycja na zanieczyszczenia.	87
5.4.2.	Hsp70 i metalotioneiny u pajaków z terenów w różnym stopniu zanieczyszczonych w odpowiedzi na zadane stresory	89
5.5.	Podsumowanie	92
6.	Wnioski	94
	Bibliografia	97
	Summary.	115
	Zusammenfassung	117

Wykaz stosowanych skrótów

Cas-3	— proteaza kaspazopodobna
CAT	— katalaza
CDNB	— 1-chloro-2,4-dwunitrobenzen
DTNB	— kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)
DTT	— 1,4-ditio-DL-treitol
EDTA	— kwas wersenowy
FDA	— dwuocian fluoresceiny
FITC	— fluoresceina isotiocyaniny
GPOX	— peroksydaza glutationowa selenozależna
GSH + GSSG	— glutation całkowity
GSH	— zredukowany glutation
GSSG	— disulfid glutationu; utleniony glutation
GST	— S-transferaza glutationowa
GSTPx	— peroksydaza glutationowa niezależna od selenu
Hsp70	— białka szoku termicznego o masie 70 kDa
JC-1	— 5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'tetraetylobenzoimidazolo-karbocyanek
Mt	— metalotioneiny
NADP ⁺	— fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma utleniona
NADPH	— fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana
PI	— jodek propidyny
pNA	— <i>p</i> -nitroanilina
PS	— fosfatydyloseryna
RFT	— reaktywne formy tlenu
SOD	— dysmutaza ponadtlenkowa
$\Delta\Psi_m$	— potencjał transbłonowy mitochondrium

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Organizmy w swym środowisku życia podlegają wpływom różnorodnych czynników stresogennych, które w zależności od siły i czasu działania mogą modyfikować ich procesy fizjologiczne, a w skrajnych przypadkach zmniejszać szanse przeżycia. Z jednej strony są to czynniki naturalne, takie jak zbyt wysoka lub zbyt niska temperatura, wilgotność, dostępność pokarmu, interakcje z innymi organizmami, z drugiej zaś są to substancje chemiczne. Wymienione elementy składają się na pojęcie „stresu środowiskowego”, rozumianego jako zespół oddziaływań o charakterze stresotwórczym lub odpowiedź organizmu na tego typu czynniki (VAN STRAALLEN, 2003). Stresory działają bezpośrednio na poziomie komórki, chociaż przesunięte w czasie pośrednie skutki ich oddziaływań mogą się manifestować na wyższych poziomach organizacji biologicznej. W badaniach ekotoksikologicznych rozwijane są koncepcje, w których oceniając efekty działania różnorodnych składowych stresu środowiskowego, korzysta się z biomarkerów, definiowanych jako „molekularne, biochemiczne, histologiczne lub fizjologiczne parametry, które na poziomie poniżej organizmu zmieniają się proporcjonalnie do stopnia ekspozycji zwierząt na działanie czynników zanieczyszczających ich środowisko” (DEPLEDGE, FOSSI, 1994; DALLINGER i in., 2000; EASON, O'HALLORAN, 2002) bądź też rozumianych jako

„zmiana na poziomie molekularnym, która może służyć za wskaźnik stanu stresu spowodowanego przez dowolny czynnik środowiskowy” (ŁASKOWSKI, MIGULA, 2004). Aby w pełni poznać kondycję fizjologiczną danej grupy organizmów, wskazane jest użycie szerokiego spektrum parametrów, które pozwoliłyby ocenić procesy metaboliczne zachodzące w komórkach, a tym samym pozwoliłyby rozstrzygać o stopniu „uciążliwości” dla organizmu oddziałujących czynników stresogennych. W odniesieniu do środowisk lądowych wiele badań w tym zakresie poświęca się bezkręgowcom glebowym, w tym stawonogom (KAMMENG i in., 2000), a wśród kręgowców również ptakom (CASINI i in., 2003) i ssakom (TIMBRELL, 1998).

Stosunkowo mało informacji na temat biochemicznych, histologicznych oraz fizjologicznych zmian, które mogłyby być wykorzystane do oceny narażenia lub wykazania skutków działania czynników stresogennych o różnym charakterze, zgromadzono dla pajaków (Araneae). Ze względu na małą wybiórczość pokarmową oraz dużą intensywność drapieżniczą bezkręgowce te uważa się za ważne regulatory liczebności wielu populacji owadów w ekosystemach łąkowych, leśnych i rolniczych (MARC i in., 1999). Pajaki występują powszechnie także na terenach zanieczyszczonych, w tym skażonych metalami ciężkimi (CLAUSEN, 1984 a; 1984 b; 1986; HUNTER i in., 1987; DEELMAN-REINHOLD, 1990; RABITSCH, 1995) i — jak niejednokrotnie wykazywano — w porównaniu z innymi grupami systematycz-

nymi zamieszkującymi tereny silnie zdegradowane mogą tolerować wysokie stężenia metali w ciele (HUNTER i in., 1987; MAELFAIT, 1996; HENDRICKX i in., 2003; WILCZEK i in., 2004). Mechanizmy tej tolerancji w omawianej grupie zwierząt są jednak bardzo słabo poznane. Szczególnie mało informacji zgromadzono na temat komórkowych reakcji na stres u pajaków ekspozowanych w kontrolowanych warunkach na różne czynniki, które składają się na pojęcie stresu środowiskowego. Przyczyną rzadkiego podejmowania prób hodowli pajaków są względy metodyczne, ogromną trudność bowiem sprawia zapewnienie, szczególnie młodym osobnikom, optymalnych warunków związanych ze specyficznymi wymaganiami pokarmowymi i wilgotnościowymi. Poważnym problemem hodowlanym jest także kanibalizm rozpowszechniony w tej grupie drapieżnych bezkręgowców. Jeśli uwzględni się wymienione ograniczenia, większość informacji o fizjologicznych reakcjach na stres pochodzi z badań prowadzonych na osobnikach odłowionych bezpośrednio z terenu lub tylko okresowo przetrzymywanych w laboratorium.

1.2. Pajaki wobec stresorów środowiskowych

Tolerancja czynników stresogennych przez organizmy jest możliwa dzięki uruchamianiu mechanizmów obronnych, których cel stanowi zachowanie wewnętrznej homeostazy. Niejednokrotnie zmiany te dotyczą bilansu energetycznego i wiążą się z przeznaczaniem części energii pochodzącej z podstawowych składowych budżetu energetycznego, czyli z produkcji (wzrostu i reprodukcji) lub/i z kosztów utrzymania organizmu, na procesy naprawcze (SIBLY, CALLOW, 1989), w tym także detoksykację i bioeliminację. Badacze tego problemu proponują kilka rozwiązań optymalnej alokacji energii w zależności od warunków środowiska oraz możliwości detoksykacji substancji toksycznych przez określone organizmy. Można założyć, że w nieska-

żonym środowisku niemal całość dostępnej energii jest wykorzystywana w procesach wzrostu i reprodukcji, wobec minimalnego przeznaczenia jej na procesy detoksykacyjne. Z kolei w środowiskach zanieczyszczonych ilość energii przeznaczonej na wzrost i reprodukcję generalnie ulega zmniejszeniu, jednakże długość życia organizmów nie zmienia się, co jest możliwe dzięki intensywnym procesom detoksykacyjnym. W tym drugim przypadku scenariusz optymalnej alokacji energii może się zmieniać w zależności od właściwości fizjologicznych organizmu, wieku czy toksyczności substancji (ŁASKOWSKI, MIGULA, 2004). Rzeczywiście w wielu badaniach ekotoksykologicznych u zwierząt ekspozowanych na stresory środowiskowe, w tym metale, stwierdza się zmiany w przyrostach biomasy (ROWE i in., 2001), rozrodczości (SPURGEON i in., 2000) i/lub tempie respiracji (MIGULA i in., 1990; ŁASKOWSKI i in., 1996; ROWE i in., 1998). Nie można wykluczyć, że zwierzęta z terenów zanieczyszczonych mogą się cechować mniejszą tolerancją na dodatkowe czynniki stresogenne, co w rezultacie skutkuje osłabieniem, a nawet wyginieciem populacji w razie zmiany warunków środowiska (STONE i in., 2001). Ostatecznie może nastąpić przebudowa składu gatunkowego zespołu i zastępowanie gatunków wrażliwych takimi, które są w stanie tolerować określone stresory środowiskowe bez wyraźnego uszczerbku w procesach reprodukcji.

Jeśli odnieść się do omówionych wcześniej zagadnień, to ekologiczna ocena stanu arachnocenoz terenów zdegradowanych wskazuje, że zwykle nie zmienia się liczebność pajaków, przebudowie natomiast ulega struktura gatunkowa (ŁUCZAK, 1984; 1987a; DĄBROWSKA-PROT, 1984; MAJKUS, 2003). W środowiskach w mniejszym stopniu zanieczyszczonych przeważają najczęściej pajaki sieciowe z rodziny krzyżakowatych (Araneidae) i omatnikowatych (Theridiidae), natomiast w środowiskach silnie zanieczyszczonych dominują słabsze, w bezpośredniej konkurencji o miejsce i pokarm, sieciowe pajaki z rodzin osnuwikowatych (Linyphiidae) i kwadratnikowatych (Tetragnathidae) oraz niebudujące sieci pogońcowate (Lycosidae) (ŁUCZAK, 1984; 1987b; DEELMAN-REINHOLD, 1990). Intere-

sujących informacji na temat tolerancji niedoboru lub nadmiaru określonych czynników biotycznych i abiotycznych dostarczają badania sukcesji fito- i zoocenozy na hałdach przemysłowych. Jakościowa analiza arachnofauny, np. hałdy górniczej „Lidice” (peryferie Ostrawy; Ostrawsko-Karwiński Okręg Przemysłowy; Republika Czeska), wskazuje, że już we wczesnych fazach rekultywacji na hałdzie tej znaleziono przedstawicieli blisko 15 rodzin pajaków, wśród których największy udział w zespole pajaków miały gatunki z rodziny osnuwиковатых (Linyphiidae — 40%), a w dalszej kolejności pająki niebudujące sieci z rodzin: skakunowatych (Salticidae), pogońcowatych (Lycosidae) i aksamitkowatych (Clubionidae) (MAJKUS, 1988). Proporcje te zostały zachowane także w późniejszych okresach rekultywacji wymienionej hałdy (MAJKUS, 2003). Skład gatunkowy arachnocenozy na obszarach zdegradowanych przez przemysł może zatem wynikać z międzygatunkowych różnic we wrażliwości tych drapieżników na działanie określonych substancji toksycznych w ich środowisku i w rezultacie sprzyjać konkurencji w wymienionej grupie stawonogów (CLAUSEN, 1984a; 1984b; GUNNARSSON, JOHNSON, 1989).

Reakcje fizjologiczne pajaków wobec określonych stresorów środowiskowych, w tym o charakterze antropogennym, często są specyficzne gatunkowo. Pająki *Enoplognatha ovata* (Theridiidae) w warunkach silnej presji zanieczyszczeń przemysłowych (Rybnicki Okręg Przemysłowy) składały puste kokony, charakteryzowała je też duża zmienność rozmiarów kokonów, jak również większa śmiertelność wylęgających się pajaków (ZIMAKOWSKA-GNOIŃSKA, TARWID, 1984; TARWID, 1987). Także przedstawiciel pogońcowatych *Pirata piraticus* (Lycosidae) zamieszkujący tereny zanieczyszczone cechował się spadkiem płodności i reprodukcji (HENDRICKX i in., 2003). W innych badaniach obserwowano natomiast, że w warunkach silnego uprzemysłowienia następował wzrost biomasy niektórych gatunków pajaków oraz nasilenie intensywności ich procesów życiowych (DĄBROWSKA-PROT, 1984; ŁUCZAK, 1987b). W środowiskach przekształconych przez przemysł stymula-

cja procesów metabolizmu ogólnego u zawiąka żółtawego *Enoplognatha ovata* (Theridiidae), osnuwika pospolitego *Linyphia triangularis* (Linyphiidae) i czaika jesiennego *Metellina segmentata* (Tetragnathidae) przewyższała tempo metabolizmu pajaków pochodzących ze słabo przekształconych ekosystemów leśnych o 25—30% (ZIMAKOWSKA-GNOIŃSKA, 1981). Badania puli nukleotydów adenylowych w przypadku pajaków ze Śląska, przedstawicieli rodzin: Linyphiidae, Araneidae, Tetragnathidae, Lycosidae wskazują ponadto, że w warunkach zanieczyszczonego środowiska nie następowało naruszenie równowagi energetycznej organizmu, o czym świadczyła wielkość ładunku energetycznego adenylatów (AEC) mieszcząca się u badanych gatunków w granicach fizjologicznie optymalnych (MARCZYK i in., 1993; WILCZEK, 1996).

W kolejnych podrozdziałach zostaną przedstawione wybrane czynniki stresowe o charakterze antropogennym (metale, pestycydy) i naturalnym (skrajne temperatury, niedobór pokarmu), na które pająki często są narażone w swoim środowisku bytowania.

1.2.1. Metale ciężkie

Miejsce zajmowane przez pająki w sieciach troficznych ekosystemów lądowych, a także ich cechy biologiczne sprawiają, że drapieżniki te są szczególnie narażone na działanie metali oraz związków organicznych (m.in. pestycydów), które dostają się do ich organizmu w wyniku bezpośredniej ekspozycji, zarówno drogą pokarmową jak i kontaktową (HOPKIN, 1989). Stosując podział zaproponowany przez DALLINGERA (1993), który został oparty na wielkości wskaźników biokoncentracji metali w tkankach, pająki zaliczono do makrokoncentratorów tych pierwiastków. Badania porównawcze kumulacji metali w ciele różnych grup bezkręgowców zebranych wokół dużych emitatorów zanieczyszczeń wskazują, że stężenia kadmu, miedzi i ołowiu u przedstawicieli pajaków reprezentujących drapieżne bezkręgowce są równie wysokie, jak u organi-

zmów detrytusożernych i wielokrotnie wyższe w porównaniu z roślinożercami (HUNTER i in., 1987; ANDREWS i in., 1989; MIGULA i in., 2005). Interesujące jest to, że wysokie stężenia metali znajdowano także u pajaków pochodzących z terenów słabo zanieczyszczonych (KNUTTI i in., 1988; WILCZEK i in., 1996; 2003; 2004). Znacznej kumulacji metali w ich ciele sprzyja przede wszystkim wysoka przyswajalność pokarmu, silnie rozwinięty polifagizm, spożywanie miękkich tkanek ofiar, a także stosunkowo niski poziom metabolizmu silnie rozbudowanych gruczołów jelita środkowego, w których stężenie metali jest zawsze wyższe niż w innych narządach (MOULDER, REICHLER, 1972; HOPKIN, 1989; WILCZEK, BABCZYŃSKA, 2000).

Do organizmu pajaka metale dostają się głównie drogą pokarmową (HOPKIN, 1989). Przewód pokarmowy stanowi więc pierwszą i najważniejszą linię obrony. Fakt ten potwierdzają badania, z których wynika, że wchłonięte metale mogą być u pajaków deponowane głównie w komórkach gruczołów jelita środkowego (HOPKIN, 1986; LUDWIG, ALBERTI, 1988a; 1988b) lub usuwane wraz z kałem (CLAUSEN, 1991). Czas magazynowania metali u pajaków zależy od rodzaju metalu (LEE i in., 1978; NABHOLTZ, CROSSLEY, 1978; HENDRICKX i in., 2003), gatunku (WILCZEK, MIGULA, 1996; KRAMARZ, 2000; HENDRICKX i in., 2003; WILCZEK i in., 2005), płci (WILCZEK i in., 2005; 2007) oraz stanu odżywienia (BROWN, 1982). Dominacja określonej strategii może zależeć jednak od stężenia metalu w pokarmie. Sugerują to wyniki badań BABCZYŃSKIEJ i MIGULI (2002), którzy zmierzili stężenie kadmu w ciele samic i samców pajaka *Pardosa lugubris* (Araneae: Lycosidae) oraz w ciele ich ofiary, muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) hodowanej na pożywce kontrolnej, zawierającej śladowe ilości kadmu oraz zawierającej wysokie stężenie tego metalu ($426 \mu\text{g Cd} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy). Porównanie stężenia kadmu w ciele drapieżcy i w ciele ofiary z obu grup doświadczalnych pozwala wnioskować o zróżnicowanej strategii: magazynowania w formie nieaktywnej przy niższym stężeniu metali w diecie lub wzmożonego wydalania, gdy stężenie wzrastało.

Dotychczasowe badania pozwoliły także wykazać liczne zależności między poziomem kumulowanych metali w ciele a strategią i intensywnością drapieżniczą pajaków (WILCZEK, MIGULA, 1996; WILCZEK i in., 1997; 2003; 2004; 2005; 2007), co potwierdzono dla pajaków ze stanowisk Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego, Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej oraz Ostrawsko-Karwińskiego Okręgu Przemysłowego, analizując poziom metali zarówno w ciele całych osobników, jak i w wybranych narządach (gruczoły jelita środkowego, gonady) (WILCZEK, BABCZYŃSKA, 2000; WILCZEK i in., 2003; 2004; 2005; 2007). Najniższe stężenia Cd, Pb, Cu i Zn cechowały osnuwиковate, reprezentowane przez *Linyphia triangularis*, które pomimo możliwości większego pobierania metali ze względu na małą wybiórczość pokarmową i dużą intensywność drapieżniczą (NENTWIG, 1983; FOELIX, 1996) odznaczały się niższym, w porównaniu z pozostałymi gatunkami, stężeniem wymienionych pierwiastków w ciele (WILCZEK, MIGULA, 1996; WILCZEK i in., 1997; 2005; 2007). Sugeruje to słabą ich przyswajalność z przewodu pokarmowego. Z kolei przedstawiciele niebudujących sieci pajaków z rodziny Lycosidae (*P. lugubris*, *P. palustris*) niezależnie od stopnia zanieczyszczenia środowiska metalami charakteryzowały się wysokim stężeniem Cd, Pb, Zn i Cu w porównaniu z wartościami, które notowano u pajaków sieciowych z rodzin: Araneidae, Linyphiidae czy Agelenidae. Z innych badań wynika, że Lycosidae przyswajały więcej Cd i Cu niż pajaki sieciowe, czego nie potwierdzono dla Pb (LARSEN i in., 1994).

Warto też zwrócić uwagę na występowanie różnic w zdolnościach do gromadzenia metali ciężkich przez samice i samce pajaków. Z porównania wartości stężeń Cd, Pb, Cu, Zn, Fe w ciele osobników obu płci, przedstawicieli rodzin Araneidae, Agelenidae, Linyphiidae, Lycosidae i Salticidae, wynika, że samce kumulują większe ilości tych pierwiastków niż samice (WILCZEK i in., 2005). Poziom Cd, Zn i Cu w gruczołach jelita środkowego pajaków pogońcowatych *Xerolycosa nemoralis* i lejkwoców *Agelena labyrinthica* również był wyższy u samców niż u samic, niezależnie od stopnia zanie-

czyszczenia stanowisk badawczych. Tylko ołów kumulował się w wyższym stężeniu w gruczołach jelita środkowego samiec *X. nemoralis*, natomiast w przypadku *A. labyrinthica* poziom tego metalu u obu płci był zbliżony (WILCZEK i in., 2007). Wy tłumaczeniem różnic w zdolnościach do bioakumulacji metali są behawioralne i fizjologiczne odmienności między samcami i samicami pajaków. Samce, w porównaniu z samicami, przechodzą mniej linień oraz żyją znacznie krócej, gdyż giną w krótkim czasie po kopulacji (FOELIX, 1996). Doświadczalnie potwierdzono, że podczas linienia konkretje mineralne mogą być usuwane z jelita, dzięki czemu obniża się pula metali zmagazynowanych w gruczołach jelita środkowego (HOPKIN, 1989). Ponadto samce po osiągnięciu dojrzałości płciowej zaprzestają polowań i pobierania pokarmu, a koncentrują się głównie na odnalezieniu samicy. Samce narażone są zatem na dłuższe niż samice okresy głodu wobec relatywnie krótszego okresu życia. Wymienione czynniki mogą zmieniać metabolizm ich gruczołów jelita środkowego i wywoływać morfologiczne zmiany w postaci powiększających się wewnątrzkomórkowych konkretji granulanych zawierających metale w wymienionym narządzie oraz w komórkach nabłonka jelitowego, co wykazano w przypadku innych bezkręgowców (BROWN, 1982).

Specyficznymi biomarkerami narażenia na metale są u zwierząt metalotioneiny (Mt) (PARK i in., 2001), jak również wewnątrz- i śródkomórkowe konkretje mineralne (HOPKIN, 1989; DALLINGER, REINBOW, 1993). Niewiele jednak jest danych na temat funkcji metalotionein u pajaków. Wcześniejsze badania, w których techniką cytometrii przepływowej porównywano liczbę komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pajaków pogońcowatych *X. nemoralis* oraz sieciowych *A. labyrinthica* i *L. triangularis* odławianych z terenów różniących się stężeniem metali w środowisku wynika, że tylko w przypadku pajaków tunelowych (*A. labyrinthica*) osobniki z terenu silnie zanieczyszczonego metalami cechowały się większym odsetkiem komórek Mt pozytywnych w wymienionym narządzie (WILCZEK i in., 2007). W innych badaniach u pogońcowatych

P. lugubris i sieciowych *A. labyrinthica* ekspozowanych na wysoką temperaturę oraz pestycyd fosforoorganiczny wykazano nasilenie produkcji metalotionein, ze wskazaniem na silniejsze reakcje u pajaków niebudujących sieci (WILCZEK, 2005). Nie można wykluczyć, że w przypadku pajaków indukcja metalotionein w odpowiedzi na stres fizyczny i chemiczny jest wyrazem ochrony antyoksydacyjnej, w mniejszym stopniu odpowiadając za bezpośrednią neutralizację metali ciężkich.

Zdecydowanie więcej informacji dla tej grupy drapieżnych bezkręgowców zgromadzono na temat możliwości deponowania metali w wewnątrz- i śródkomórkowych konkretjach mineralnych. Metale odkładają się u pajaków najczęściej w komórkach trawiennych gruczołów jelita środkowego jako tzw. mineralne ziarnistości (BROWN, 1982; HOPKIN, 1989) lub okresowe sferyty (LUDWIG, ALBERTI, 1988a), skąd w sposób holokrynowy mogą być usuwane do światła jelita (HOPKIN, 1989). Spośród wyróżnionych przez HOPKINA (1986) czterech typów granul: wewnątrzkomórkowych A, B i C oraz pozakomórkowych D, najistotniejsze w detoksykacji metali u pajaków wydają się granule typu B, w których stwierdzono miedź, rtęć, kadm, cynk, ołów i żelazo.

1.2.2. Pestycydy

Pomimo że pająki zwykle nie są bezpośrednim celem użycia pestycydów, to często negatywne skutki działania tego typu związków dotyczą także tej grupy zwierząt. Oddziaływanie to z jednej strony dotyczy bezpośredniej toksyczności stosowanych środków ochrony roślin względem pajaków (STARK i in., 1995; TOFT, JENSEN, 1998; NYFFELER, SUDERLAND, 2003), z drugiej natomiast jest wynikiem drastycznego spadku liczebności ich ofiar na terenie, na którym pestycydy są stosowane (HAMERS, KROGH, 1997; VAN HAMBURG, GUEST, 1997; MARC i in., 1999).

Testy przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych wskazują, że pająki cechuje zróżnicowa-

na wrażliwość na pestycydy stosowane w zabiegach agrotechnicznych. Na przykład przedstawiciele rodziny Anyphaenidae, *Hibana velox*, przejawiały 100% śmiertelność podczas aplikacji niskich stężeń takich związków jak: chlorpyrifos, ethion, carbaryl czy dicofol, podczas gdy inne związki, na przykład azadirachtin czy diflubenzuron, nie wywoływały toksycznych efektów nawet wówczas, gdy stosowano je w wysokich stężeniach (AMALIN i in., 2000). Wyniki badań ekologicznych wskazują ponadto na zależną od płci wrażliwość pająków na działanie pestycydów. Akarycyd (karate; λ -cyhalotryna) powodował u *Pardosa amentata* (Lycosidae) blisko 50% śmiertelność samców, gdy tymczasem odsetek ginących samic był ponad 2-krotnie mniejszy (HOF i in., 1995). Skutki stosowania pestycydów zależą u pająków od pory roku. Dorosłe *P. amentata* eksponowane na λ -cyhalotrynę późną jesienią lub na początku zimy okazały się stosunkowo mało wrażliwe na zastosowany związek, podczas gdy w okresie wiosenno-letnim taka sama ekspozycja powodowała wysoką śmiertelność (HOF i in., 1995). Powodem wzrostu wrażliwości pogońcowatych na pestycyd było prawdopodobnie wejście w okres reprodukcji, co wiązało się z nasiloną ruchliwością pająków poszukujących partnerów i powodowało częstsze kontakty ze stresorem chemicznym. Także kondycja fizjologiczna drapieżników mogła być w tym czasie obniżona, samce giną bowiem najczęściej krótko po kopulacji. W przypadku samic wydatki energetyczne na produkcję kokonów mogły ulec zmniejszeniu w wyniku nasilenia reakcji detoksykacyjnych.

Wczesne i silne efekty działania pestycydu na organizm pająka manifestują się w postaci upośledzenia zdolności lokomotorycznych, co obserwowano zarówno u przedstawicieli pająków niebudujących sieci *P. amentata* (Lycosidae) (HOF i in., 1995), jak i sieciowych *Oedothorax apicatus* (Linyphiidae) (JAGERS OP AKKERHUIS i in., 1997). Efekty te utrzymywały się nawet przez kilka dni po aplikacji, przejawiając się m.in. zaburzeniami w zachowaniu łowieckim (HOF i in., 1995). W przypadku zastosowania pestycydów fosforoorganicznych przyczyną dysfunkcji motorycznych są najczęściej zmiany przekazywania

synaptycznego związane z hamowaniem aktywności acetylocholinesterazy (AChE). Z porównania efektu działania dimetoatu u dwóch gatunków pająków: sieciowego *A. labyrinthica* (Agelenidae) i aktywnie polującego *P. lugubris* (Lycosidae) wynika, że zarówno jedno-, jak i wielokrotna aplikacja powoduje obniżenie aktywności wymienionego enzymu u przedstawicieli rodziny Agelenidae. W przypadku *P. lugubris* nie zanotowano istotnych różnic w aktywności AChE zarówno w grupach jednokrotnie, jak i wielokrotnie eksponowanych na pestycyd (BABCZYŃSKA i in., 2006). Rezultaty te są podobne do tych, które uzyskali we wcześniejszych badaniach BABCZYŃSKA i MIGULA (2002) po aplikacji pająkom tego samego gatunku (*P. lugubris*) innego pestycydu fosforoorganicznego — fenitrotonu. Także i w tym przypadku odpowiedź pająków pogońcowatych była słaba niezależnie od płci.

Z badań NIELSENA i in. (1997), którzy metodą kontaktową zatruwali cypermetryną (pestycyd z grupy pyretroidów) *Pardosa prativaga* (Lycosidae), wynika natomiast, że aktywność takich enzymów jak S-transferaza glutationowa (GST) i peroksydaza glutationowa (GPOX) po 30 min od zastosowania wymienionego związku ulegała blisko 50% obniżeniu w stosunku do aktywności wyjściowej. Kolejne pomiary (po 12, 24, 48, 96 godz.) świadczyły jednak o stopniowym powrocie aktywności GST do wartości kontrolnych, a w przypadku GPOX nawet nasileniu aktywności tego enzymu po 12 godz. od aplikacji. Dwuetapowa odpowiedź organizmu na zastosowany związek wskazuje na możliwość regeneracji aktywności wymienionych enzymów i sugeruje, że glutation oraz enzymy związane z jego metabolizmem w przypadku wymienionego gatunku pogońcowatych mogą odgrywać istotną rolę detoksykacyjną, uczestnicząc w antyoksydacji.

1.2.3. Temperatura i głodzenie

Temperatura jest czynnikiem silnie limitującym aktywność ruchową pająków, wymusza-

jąc w sposób naturalny okresy głodu. Zakres temperatur, w którym pająki są zdolne złapać ofiarę, obejmuje najczęściej przedział 21–35°C. Poniżej 21°C pająki sieciowe nie są w stanie złapać ofiary, nim ta ucieknie z sieci, natomiast powyżej 35°C są narażone na zbyt duże straty wody i szok cieplny (FOELIX, 1996). Przekroczenie górnej granicy tolerancji termicznej powoduje odrętwienie, a zbyt długie oddziaływanie wysokiej temperatury prowadzi w konsekwencji do śmierci organizmu (PULZ, 1987; SCHMALHOFER, 1999).

W warunkach działania stresora termicznego w przypadku pajaków obserwuje się wiele przystosowań behawioralnych oraz fizjologicznych. Zagadnienia te zostały stosunkowo dobrze opisane w literaturze przedmiotu i generalnie nie odbiegają od reakcji cechujących inne organizmy ektotermiczne (NENTWIG, 1987; FOELIX, 1996). Bezkręgowce te wybierają na przykład miejsca o sprzyjających warunkach termicznych, odpowiednio ustawiając ciało względem padających promieni słonecznych czy w warunkach silnego nasłonecznienia, zmieniając barwę ciała. Temperatura też jest czynnikiem, który wywiera bezpośredni wpływ na rozrodczość, w tym na czas dojrzewania osobników (LI, 1995; LI, JACKSON, 1996), produkcję jaj (ZHAO, 1984; LI, 1995) czy też przeżywalność pajaków (LI, 2002). Czynniki termiczne oddziałuje w istotny sposób na liczbę linii, które pajak przechodzi przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. W wyższej temperaturze częstotliwość linienia jest mniejsza niż w niższej, w której dla osiągnięcia tego samego etapu rozwoju postnatalnego wymagane jest częstsze linienie (LI, 2002). Wysoka temperatura skraca czas życia dorosłych osobników oraz zmniejsza liczbę jaj produkowanych przez samice (LI, JACKSON, 1996).

Pająki często są narażone na okresowy niedobór pokarmu w ich środowisku bytowania, toteż wykazują dużą tolerancję na taki czynnik stresowy. Dotychczasowe prace zajmujące się tym zagadnieniem skupiały się głównie na behawioralnych i fizjologicznych przystosowaniach do przetrwania okresu głodu, w mniejszym stopniu koncentrując się na komórkowych konsekwencjach

tego zjawiska. Udokumentowano, że tolerancja okresu głodu u pajaków zależy od pory roku (NAKAMURA, 1987), stadium rozwojowego oraz płci (TANAKA, ITO, 1982; NENTWIG, 1986; 1987; WISE, 1993). Dorosłe samice aktywnie polującego pajaka *Lycosa lenta* przeżywały nawet 208 dni bez pożywienia, co stanowiło aż 90% średniej długości życia dobrze odżywianych osobników. Z kolei osobniki pajaków sieciowych *Filistata hibernalis* (Filistatidae) w podobnych warunkach przeżywały 305 dni bez pokarmu (ANDERSON, 1974). Już po kilku dniach głodzenia dochodziło do wyraźnego zmniejszenia masy ciała pajaków jako wyraz redukcji zapasów w jelicie spożytego pokarmu (NENTWIG, 1987). W ciągu 140 dni głodzenia *Lycosa lenta* traciła 33% masy, a długość jej opistosomy skracała się z 8,1 mm do 6,3 mm. W tych samych warunkach *F. hibernalis* traciła 41% swej masy, odwłok zaś ulegał skróceniu z 7,1 mm do 5,5 mm. Interesujący jest fakt, że podczas głodzenia nie zmieniała się długość prosomy pajaków (ANDERSON, 1974).

Podczas głodu następują ilościowe zmiany substancji zapasowych w komórkach trawienych. Najistotniejsze to obniżenie w nich poziomu glikogenu i lipidów. Obserwowano także zmiany morfologiczne w postaci zwiększenia liczby wakuol wydzielniczych, które wypełniały większą część komórki. Nie jest wykluczone, że zmiany te były wynikiem autofagii, która w komórkach jest aktywowana między innymi w odpowiedzi na niedobór czynników odżywczych. Wakuole pokarmowe występowały rzadko i często były zdegenerowane. Jądro komórkowe, mitochondria i retikulum endoplazmatyczne pozostawały w wyniku głodzenia nie zmienione. W warunkach niedoboru pokarmu nie wykryto istotnych różnic w komórkach sekrecyjnych, natomiast w tkance pośredniej znacząco malała ilość kropeł tłuszczu (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b).

Sposobem na radzenie sobie z brakiem pokarmu jest zastosowanie strategii „siedź i czekaj”. Strategia ta stanowi pewne rozwiązanie problemu dzięki przeczekaniu w bezruchu okresu głodu, aż do pojawienia się ofiary. Taka taktyka umożliwia przetrwanie, ogranicza zużycie energii i jest alternatywą dla poszukiwania no-

wego środowiska życia (WISE, 1993). Podczas długiego okresu głodu niemal ustaje aktywność ruchowa pajaków, a zmagazynowana energia jest wykorzystywana do podtrzymania podstawowej przemiany materii (NAKAMURA, 1987). W przypadku długotrwałego braku pokarmu pajaki, aby przeżyć, nie powiększają rozmiarów ciała. Jednak pomimo tak niekorzystnych warunków mogą się nadal rozmnażać, chociaż liczba i masa składanych jaj są niskie. Oprócz obniżonej płodności, w przypadku małych i niedożywionych samic, stwierdzono także opóźnienie okresu wytwarzania kokonów (NAKAMURA, 1987; WISE, 1993).

W ciągu kilku dni od rozpoczęcia głodzenia szybko spada tempo respiracji, po czym stabilizuje się na niezmiennym poziomie. Redukcja tempa metabolizmu u pajaków zwykle nie przekracza 40–60% wartości notowanych dla zwierząt karmionych regularnie, osiągając niższe wartości u samic niż u samców (ANDERSON, 1974; GREENSTONE, BENNETT, 1980; TANAKA, ITO, 1982). W przypadku głodzącej *Lycosa pseudoannulata* tempo metabolizmu obniża się o 17%, podczas gdy w przypadku innego gatunku pogońcowatych, *Pardosa astrigera*, redukcja tempa metabolizmu sięga 63% u samic i 48% u samców (TANAKA, ITO, 1982). U pająka sieciowego *F. hibernalis* tempo respiracji maleje maksymalnie o 40% (ANDERSON, 1974).

Ważnym ograniczeniem dla pajaków jest nie tylko całkowity brak pokarmu, lecz także słabo zróżnicowana dieta. Badania wskazują, że zarówno dla pajaków sieciowych (ZHAO, 1988), jak i niebudujących sieci (GREENSTONE, 1979; UETZ i in., 1992) ważna jest dieta urozmaicona, w której można znaleźć różne gatunki ofiar. W przypadku przedstawicieli rodziny Lycosidae wykazano na przykład wzrastającą śmiertelność w warunkach laboratoryjnych, gdy dieta opierała się tylko na muszkach *D. melanogaster*, ponieważ w ciele tych ofiar brak jest kwasu linolowego i linolenowego, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju pajaków (UETZ i in., 1992).

1.3. Komórkowe reakcje na stres

Chociaż koncepcję stresu można rozważać na różnych poziomach organizacji biologicznej, to najbardziej powszechne ujęcie tego problemu dotyczy indywidualnego organizmu. Jak zaprezentowano w poprzednich rozdziałach, w literaturze przedmiotu opisano behawioralne i fizjologiczne reakcje pajaków na działanie wielu czynników stresogennych, jednak komórkowe reakcje na stres u tych drapieżników poznano w ograniczonym zakresie.

Stresory, w zależności od rodzaju, siły i czasu oddziaływania, mogą powodować określone dysfunkcje na poziomie komórkowym, które klasyfikuje się w skali trzystopniowej (KORSLÖÖT, 2002). Są to:

- niewielkie uszkodzenia, które mogą być reperowane przez komórkowy system obrony, dzięki czemu całkowicie zostaje przywrócona homeostaza komórki;
- uszkodzenia w stopniu średnim, które dzięki mechanizmom naprawczym częściowo zostają usunięte, komórka pozostaje żywa, lecz jej kondycja metaboliczna jest obniżona;
- duży stopień uszkodzeń, czego efektem jest zahamowanie procesów metabolicznych i/lub utrata integralności organelli komórkowych, co prowadzi komórkę do śmierci.

Skutki oddziaływania czynników stresowych najszybciej pojawiają się na poziomie molekularnym i dotyczą zmian w syntezie polipeptydów, utleniania i denaturacji struktur białkowych, utleniania lipidów i nukleotydów (efekt pierwszorzędowy), uszkodzenia błon, DNA, mikrofilamentów, zaburzeń procesu oddychania wewnątrzkomórkowego i produkcji energii (efekt drugorzędowy). Konsekwencją tych zmian jest rozpad struktur komórkowych i zahamowanie procesów metabolicznych (efekt trzeciorzędowy).

Uszkodzenia spowodowane działaniem stresorów środowiskowych uruchamiają reakcje naprawcze (np. detoksykacyjne, antyoksydacyjne), które całkowicie lub częściowo przywracają homeostazę komórkową. W tym drugim przypadku komórka pozostaje żywa, lecz jej kondycja me-

taboliczna jest obniżona. W skrajnych przypadkach, gdy stopień uszkodzenia jest duży, komórka ginie, m.in. na drodze apoptozy lub nekrozy (KORSLOOT, 2002).

W kolejnych podrozdziałach zostaną omówione niektóre biomarkery, które mogą być mierzone u zwierząt w celu oceny efektów oddziaływania czynników stresogennych, zarówno naturalnych jak i antropogennych, na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach.

1.3.1. Systemy antyoksydacyjne

Stres oksydacyjny oznacza sytuację, w której produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) przekracza możliwość ich unieczynniania oraz zdolność naprawy uszkodzonych struktur komórkowych. Ten rodzaj stresu występuje w wielu sytuacjach, zwykle w wyniku ekspozycji komórek, tkanek czy organizmów na dodatkowe źródła RFT bądź zwiększenie tempa ich endogennej produkcji. W takim ujęciu prooksydacyjny charakter wykazują stresory antropogeniczne, na przykład metale (KANG, 1997; LAGADIC, 1999; PULIDO, PARRISH, 2003), pestycydy (MASOUD i in., 2003), policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) (CRUZ-RODRIGUEZ, CHU, 2002), polichlorowane bifenylole (PCB) (RODRIGUEZ-ARIZA i in., 2003), oraz stresory naturalne, takie jak skrajne warunki termiczne (GORMAN i in., 1999) czy brak pokarmu (głodzenie) (PASCUAL i in., 2003; MORALES i in., 2004).

Wzrost stężenia reaktywnych form tlenu (np.: anionorodniki ponadtlenkowe, nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe, rodniki wodoronadtlenkowe, ozon) uszkadza biologiczne makromolekuły: kwasy nukleinowe, białka, lipidy, a oksydacyjnie zmodyfikowane cząsteczki zaburzają prawidłowe funkcje komórek, co może doprowadzić do ich śmierci (RODRIGUEZ-ARIZA i in., 2003). W komórkach powszechnie występują jednak elementy systemu obrony antyoksydacyjnej, którymi zarówno w przypadku kręgowców, jak i bezkręgowców są m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i katalaza (CAT), jak

również glutation (GSH) i enzymy związane z metabolizmem tego tripeptydu (peroksydazy glutationowe — selenozależna, GPOX i niezależna od selenu GSTPx; S-transferaza glutationowa, GST) (AHMAD i in., 1989; AHMAD, 1995; O'BRIEN, TEW, 1996; VAN BLADEREN, 2000; FERNANDEZ-CHECA, 2003).

Stosunkowo niewiele informacji na temat antyoksydacyjnych reakcji obronnych zgromadzone dla pajaków, szczególnie w odniesieniu do kontrolowanego działania czynników stresogennych o różnym charakterze. Większość informacji pochodzi z badań prowadzonych na osobnikach odłowionych bezpośrednio z terenu. Wynika z nich, że w warunkach środowiska zanieczyszczonego metalami reakcje antyoksydacyjne tych drapieżników, podobnie jak i inne enzymatyczne reakcje detoksykacyjne, są gatunkowo specyficzne (WILCZEK, 2005; WILCZEK i in., 2003; 2004; 2007). Pająki tunelowe *A. labyrinthica* (Agelenidae) z terenów silnie zanieczyszczonych cynkiem i ołowiem (rejon olkuski) charakteryzował wysoki poziom GPOX i GSTPx oraz wysokie stężenie glutationu w tkankach. W tych samych warunkach pająki niebudujące sieci *P. lugubris* (Lycosidae) cechowało niższe stężenie GSH i niższa aktywność GPOX i GSTPx niż notowane u pajaków sieciowych (WILCZEK i in., 2004). Także z badań na innym przedstawicielu rodziny Lycosidae, *P. palustris*, wynika, że wysokie stężenia Zn, Pb i Cd w ciele osobników tego gatunku korelowały z wysoką aktywnością CAT. Z kolei osnuwik *L. triangularis* (Linyphiidae) cechował się nasileniem reakcji antyoksydacyjnych związanych z aktywnością SOD i CAT, przy niskiej kumulacji metali (WILCZEK, MIGULA, 1996). W warunkach silnego zanieczyszczenia u przedstawicieli wymienionych rodzin pajaków notowano nasilenie procesów enzymatycznej biotransformacji ksenobiotyków (MARCZYK i in., 1993; VIARENGO, 1989; WILCZEK, MIGULA, 1995; WILCZEK i in., 1997). Dla pajaków aktywnie polujących (*P. palustris*) znamieną była zarówno aktywizacja procesów hydrolizy, katalizowanych przez karboksyloesterazy (CarE), jak i reakcje sprzęgania angażujące GST, gdy tymczasem u pajaków sieciowych *L. triangularis* było to głównie nasilenie reakcji

katalizowanych przez S-transferazy glutationowe (WILCZEK, MIGULA, 1996; WILCZEK, 1996; WILCZEK i in., 2003). Dotychczasowe badania wskazują ponadto, że reakcja na stres spowodowana życiem w środowisku chronicznie skażonym metalami ciężkimi różni samice od samców. Ważnym elementem obrony przed wysokim stężeniem metali ciężkich i ich prooksydacyjnymi konsekwencjami jest u samców glutation (GSH), podczas gdy w enzymatycznej obronie antyoksydacyjnej uczestniczy katalaza (CAT). Z kolei reakcje antyoksydacyjne samic różnych gatunków opierają się zarówno na zwiększonej aktywności peroksydaz glutationowych, jak i katalazy, chociaż poziom tych enzymów jest gatunkowo zróżnicowany (WILCZEK i in., 2007). Nie jest wykluczone, że samice w warunkach wzmiankowanego wcześniej większego narażenia na zanieczyszczenia dla zabezpieczenia materiału genetycznego i swoich możliwości reprodukcyjnych są w stanie wykorzystywać różnorodne mechanizmy detoksykacyjne, nawet kosztowne energetycznie.

1.3.2. Apoptoza i nekroza jako biomarkery stresu

W warunkach fizjologicznych mechanizm apoptozy odpowiada za zachowanie właściwej równowagi między intensywnością proliferacji a tempem usuwania uszkodzonych lub zbędnych komórek (ZAKERI, LOCKSHIN, 2002). Zaburzenia przebiegu tego procesu wymuszone na przykład stresorami środowiskowymi mogą zmniejszać kondycję fizjologiczną danego narządu i w ostateczności całego organizmu. Apoptozę uważa się obecnie za wrażliwy i wczesny wskaźnik chronicznie działającego stresu (PIECHOTTA i in., 1999; SWEET i in., 1999). Do programowanej śmierci dochodzi, gdy komórka po zadziałaniu określonych endo- lub egzogennych bodźców uruchamia mechanizmy prowadzące do jej samounicestwienia. Proces ten mogą stymulować różnorodne czynniki, na przykład promieniowanie (SINGH, 2000), temperatura (GORMAN i in.,

1999), substancje chemiczne (RUDOLF, CERVINKA, 2006) czy niedobór substratów do procesów metabolicznych (KIESSLICH i in., 2005). Komórka wchodząca na drogę apoptozy podlega określonym zmianom morfologicznym i biochemicznym. Mechanizmy dotyczące tego zagadnienia szeroko omówiono w wielu przeglądowych opracowaniach głównie dotyczących kręgowców (np. KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ, 2002; BÖHM, SCHILD, 2003). W przypadku zwierząt bezkręgowych poznano je w mniejszym stopniu. Mimo że ciągle odkrywa się nowe fakty tłumaczące mechanizmy obserwowanych zjawisk, to najwięcej danych zgromadzono dla muszki owocowej *D. melanogaster* i nicienia *Caenorhabditis elegans* (SESHAGIRI, MILLER, 1997; LEE, BAEHRECKE, 2000).

Szczególnie mało jest informacji na temat mechanizmów apoptozy u pajaków. Odsetek komórek apoptotycznych rejestrowany techniką cytometrii przepływowej w gruczołach jelita środkowego dorosłych samic pogońcowatych *P. lugubris* i lejkwców *A. labyrinthica* (WILCZEK, 2005) wskazuje, że był on blisko dziesięciokrotnie niższy w porównaniu z wartościami, które metodami histologicznymi stwierdzono w wątrobotrzustce ślimaka winniczka *Helix pomatia* (1,1%) (CHABICOVSKY i in., 2004), ale ponad 10-krotnie wyższy od poziomu, który wykazano w wątrobie myszy (0,01%) (CHABICOVSKY i in., 2003). Wskazuje to, że stopień zmian apoptotycznych, który nieindukowany dodatkowymi czynnikami, jest specyficzny gatunkowo i może zależeć od ogólnej aktywności metabolicznej danego narządu. W badaniach dotyczących genetycznej kontroli programowanej śmierci komórkowej tylko w przypadku jednego gatunku pajaka, *Araneus ventricosus*, opisano klonowanie i filogenezę cDNA kodującego homolog DAD1 (*defender against apoptotic cell death 1*). Białko to hamowało apoptozę w odpowiedzi na temperatury niską i wysoką, na które ekspozowano osobniki wymienionego gatunku (LEE i in., 2003). Podobną rolę DAD1 wykazano u innych gatunków zwierząt na przykład w komórkach linii tsBN7 chomika, nicienia *C. elegans* czy w komórkach ludzkich, a w przypadku roślin u rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis*

thaliana (NAKASHIMA i in., 1993; SUGIMOTO i in., 1995; GALLOIS i in., 1997). Sugerowana sekwencja aminokwasów budujących białko DAD1 w przypadku *Araneus ventricosus* była w 75,4% i 74,6% homologiczna z podobnym białkiem opisanym odpowiednio u muszki *D. melanogaster* i żaby szponiastej *Xenopus laevis* oraz w 73,1% homologiczna z białkiem znalezionym u ssaków: *Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Mesocricetus auratus*, *Rattus norvegicus* i *Mus musculus* (LEE i in., 2003).

Potencjalnymi stymulatorami śmierci komórkowej mogą być m.in. czynniki zwiększające ryzyko generowania reaktywnych form tlenu (RFT) (MIZUTANI i in., 2002; PULIDO, PARRISH, 2003; SREEDHAR, CSERMELY, 2004). W zależności od stężenia RFT w komórce podejmowana jest decyzja o rodzaju śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy (RAFFRAY, COHEN, 1997). Apoptoza zachodzi zwykle w następstwie stresu oksydacyjnego o mniejszym nasileniu, w odróżnieniu od nekrozy, którą stymuluje silny stres oksydacyjny (COURTIN i in., 2002; PROSKURYAKOV i in., 2003). Podstawowym czynnikiem determinującym rodzaj śmierci komórkowej w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest poziom wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, wykorzystywanego we wszystkich szlakach aktywacji kaspaz, enzymów proteolitycznych kontrolujących apoptozę (RICHTER i in., 1996). Sugeruje się, że niskie stężenia reaktywnych form tlenu, przejściowo zmniejszające stężenie ATP, prowadzą komórki do śmierci na drodze apoptozy, gdy tymczasem wysokie stężenia nadtlenu wodoru, trwale obniżając zasoby wewnątrzkomórkowego ATP, są przyczyną śmierci nekrotycznej (GARDNER i in., 1997; LEIST i in., 1997). Jak wynika z badań LEIST i in. (1999), utrzymanie stężenia ATP w komórkach na poziomie przekraczającym 50% wartości wyjściowych jest wystarczające, aby spowodować przekierowanie komórki ze szlaku śmierci nekrotycznej w kierunku śmierci apoptotycznej. Uważa się także, że przejście w kierunku przeciwnym, tzn. od apoptozy do śmierci nekrotycznej może wynikać z obniżenia się stężenia ATP w wyniku aktywacji poli(ADP-rybozy) polimerazy (PARP), która podczas apoptozy jest substratem kaspazy-3 i kaspazy-7 (HERCEG,

WANG, 2001). Śmierć komórki na drodze apoptozy może się zmieniać w formę śmierci nekrotycznej także w wyniku bezpośredniego hamowania aktywności kaspaz. Również i w tym mechanizmie zwrócono uwagę na hamującą rolę wzrastającego stężenia H_2O_2 , który utleniał grupy tiolowe aminokwasów w centrum aktywnym wymienionych enzymów (SAMALI i in., 1999; CHANDRA i in., 2000), co opóźniało lub całkowicie uniemożliwiało zajście wymienionego procesu (HAMPTON, ORRENIUS, 1997; HAMPTON i in., 2002; PRUSKI, DIXON, 2002).

Dotychczasowe badania wskazują na strategiczną rolę mitochondriów w inicjacji śmierci komórkowej (BORUTAITE, BROWN, 2003; FERNANDEZ-CHECA, 2003; KROEMER, 2003; ORRENIUS, 2004). W dużym uproszczeniu, we wczesnych etapach tego procesu dochodzi do otwierania porów mitochondrialnych, tzw. megakanalów, w wyniku zmniejszenia się stosunku ATP/ADP i/lub obniżenia poziomu NAD(P)H i zredukowanego glutationu, obniżenia się potencjału transbłonowego mitochondrium ($\Delta\Psi_m$) oraz modyfikacji składu macierzy mitochondrialnej, w tym wzrostu w niej stężenia Ca^{2+} (DESAGHER, MARTINOU, 2000; PARONE i in., 2002; LECEOUR i in., 2004). W kolejnych etapach następuje uwolnienie międzybłonowych protein, na przykład cytochromu *c*, rozpoczynających ostateczną fazę apoptotycznej kaskady (GUPTA, 2001; PARONE i in., 2002). Uwolnienie cytochromu *c* aktywuje białko Apaf-1 (cytozolowe białko adaptorowe) do utworzenia oligomerycznego kompleksu — apoptosomu, który aktywuje kaspazę-9, prowadząc do aktywacji kaskady kaspaz i/lub dokonuje proteolizy białek komórkowych (SREEDHAR, CSERMELY, 2004). W przypadku nicienia *C. elegans* homologiem Apaf-1 jest białko Ced-4, które nie zawiera sekwencji inhibitorowych i do aktywacji nie wymaga cytochromu *c* (BOSSY-WETZEL, GREEN, 1999), podczas gdy u owadów cytochrom *c* pełni funkcję podobną do funkcji u ssaków, chociaż nie jest uwalniany do cytoplazmy i ulega zmianom konformacyjnym w mitochondrium (RODRIGUEZ i in., 1999).

Wśród dominujących czynników uruchamiających mitochondrialny szlak śmierci wymienia

się reaktywne formy tlenu. Proapoptotyczny mechanizm działania, na przykład H_2O_2 , prawdopodobnie opiera się na blokowaniu przepływu elektronów na poziomie reduktazy NADH-Q (kompleks NADH-dehydrogenaza; kompleks I) w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, co w ostateczności prowadzi do formowania anionorodników ponadtlenkowych, które spontanicznie lub w obecności SOD zwiększają pulę H_2O_2 (VIDEIRA i in., 2001; MIZUTANI i in., 2002; TADA-OIKAWA i in., 2003). Powstający nadtlenek wodoru jest w stanie otwierać megakanały i indukować zmiany $\Delta\Psi_m$, uruchamiając kolejne etapy apoptozy. Spadek $\Delta\Psi_m$ poniżej wartości potencjału bramkującego kanały może być pierwszym sygnałem wejścia na drogę śmierci programowanej (ZAMZAMI i in., 1995). Według niektórych badaczy, spadek potencjału błonowego mitochondriów pojawia się dopiero po ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej komórek (CASTEDO i in., 1995; DENECKER i in., 2001). Zmiany $\Delta\Psi_m$ następują prawie równocześnie we wszystkich mitochondriach danej komórki (ZAMZAMI i in., 1995; MARZO i in., 1998), ponieważ sygnały (Ca^{2+} , cytochrom *c*, kaspazy) powstające w pojedynczym mitochondrium mogą się przenosić na inne mitochondria. Długotrwałe utrzymywanie się niskiego potencjału mitochondrialnego jest wskaźnikiem wchodzenia komórek w proces apoptozy. Jeśli depolaryzacja dotyczy pojedynczych mitochondriów, to są one rozpoznawane jako nieprawidłowe i podlegają zjawisku autofagii. Spadek potencjału mitochondrialnego w większej liczbie tych organelli doprowadza zwykle do uwolnienia cytochromu *c* i AIF (czynniki indukcji apoptozy), a przy odpowiednim stężeniu ATP także do aktywacji kaspaz. Gwałtowne załamanie się wartości potencjału błonowego w większości mitochondriów komórki, wyczerpywanie się ATP, prowadzi do nekrozy. Udokumentowano, że w przypadku, gdy ponad 90% mitochondriów komórki ma wysoki $\Delta\Psi_m$, taka komórka cechuje się znaczną wydolnością energetyczną (LECOEUR i in., 2004). Dlatego też pomiar zmian potencjałów mitochondrialnych ($\Delta\Psi_m$) jest uważany za dobry wskaźnik kondycji energetycznej i fizjologicznej

zarówno pojedynczych komórek, tkanek, jak i całych narządów (TIANO i in., 2001; SALEH i in., 2003), może też być wykorzystywany w badaniach ekotoksykologicznych jako efektywny biomarker wczesnych, subkomórkowych skutków oddziaływania substancji chemicznych. Wykazano na przykład, że rejestracja zmian potencjału mitochondrialnego po zastosowaniu niskich dawek związków fosforoorganicznych pozwala wychwycić zaburzenia funkcji mitochondriów pomimo braku wyraźnego hamowania AChE (VIDEIRA i in., 2001). W obecnie stosowanych metodach do pomiaru $\Delta\Psi_m$ wykorzystuje się lipofilowe, kationowe barwniki fluorescencyjne, które mają właściwość gromadzenia się w macierzy mitochondrialnej. Do najczęściej stosowanych należą takie, jak: rodamina 123 (MEDINA i in., 2002), jodek 3,3'-diheksylooksokarbocyaninu (DiOC613) (ROTTENBERG, WU, 1998) czy 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzoimidazolo-karbocyanin (JC-1) (SALVIOLI i in., 1997).

Większość typowych dla apoptozy zjawisk jest konsekwencją aktywacji kaspaz — proteaz cysteinowych, stąd tendencja do identyfikowania apoptozy kaspazozależnej z tymi enzymami. Obecność kaspaz potwierdzono zarówno u kręgowców (RAFFRAY, COHEN, 1997; HAMPTON i in., 2002), jak i u organizmów bezkręgowych (CIKALA i in., 1999; DAISH i in., 2004). Jednak wykazano także możliwość śmierci apoptotycznej na drodze niezależnej od tych enzymów (LEIST, JÄÄTTELÄ, 2001; LOCKSHIN, ZAKERI, 2002; KURANAGO, MIURA, 2007). Ekspresja kaspaz następuje w formie nieaktywnych proenzymów, które są proteolitycznie przekształcane, tworząc aktywne tetrametry (STENNICKE, SALVESEN, 2000). W katalizie ataku proteolitycznego na określone substraty, kaspazy wykorzystują cysteinę centrum aktywnego oraz dokonują ich cięcia zawsze po reszcie kwasu asparaginowego. Wykazano, że cysteina centrum aktywnego jest szczególnie podatna na utlenianie lub alkilację grupy tiolowej (NOBEL i in., 1997). Interesujące jest, że komórki nie mające kaspaz giną głównie na drodze nekrozy, w odróżnieniu od komórek, w których ekspresja wymienionych enzymów kieruje komórkę na szlak apoptozy (KOLENKO i in., 1999). Potwierdzają to m.in. rezultaty badań uzyskane

na myszach, u których brak kaspazy-3 i kaspazy-9 kierował komórki w kierunku śmierci nekrotycznej (OPPENHEIM i in., 2001). W pracach podkreśla się wrażliwość wymienionych enzymów na reaktywne formy tlenu, głównie nadtlenu wodoru, dla którego wykazano inhibitoryjną rolę w odniesieniu na przykład do kaspazy-3 (HAMPTON, ORRENIUS, 1997; BORUTAITE, BROWN, 2001; HAMPTON i in., 2002).

Ważnym, komórkowym antyoksydantem, który pozwala utrzymać wymienione enzymy w ich aktywnej formie, jest glutation (HAMPTON, ORRENIUS, 1997). Obniżenie stężenia tego tripeptydu może osłabiać obronne mechanizmy antyoksydacyjne komórki i kierować je na szlaki śmierci nekrotycznej (JACOBSON, 1996; VAN DEN DOBBELSTEEN i in., 1996).

Zgodnie z powszechnie panującą opinią, nekroza jest skutkiem pasywnej degeneracji i przejawem patologii, dlatego uważa się, że nie stanowi żadnego mechanizmu adaptacyjnego. Niektórzy badacze są jednak zdania, że w pewnych przypadkach potrzebna jest silna reakcja zapalna, na przykład gdy konieczna jest mobilizacja układu immunologicznego. W takiej sytuacji uruchomienie szlaku nekrozy jest zjawiskiem pozytywnym, a nawet pożądanym (PROSKURYAKOV i in., 2003). Śmierć komórek na drodze nekrozy, w odróżnieniu od apoptozy, stanowi proces przypadkowy i bierny. Proces ten obejmuje całe zespoły komórek. Zachodzi pod wpływem różnorodnych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych, które w bardzo krótkim czasie doprowadzają do ciągu zmian morfologicznych, utraty kontroli ciśnienia osmotycznego i pęcznienia komórek (RAFFRAY, COHEN, 1997; PROSKURYAKOV i in., 2003). Napływające do wnętrza komórki jony Ca^{2+} aktywują nukleazy, dokonujące niespecyficznego degradacji DNA w przypadkowych miejscach chromatyny (SUN i in., 1994). W późniejszych etapach nekrozy jest obserwowane pęcznienie mitochondriów, utrata ciągłości błon plazmatycznych oraz wyciek zawartości komórek, łącznie ze składnikami lizosomów, do przestrzeni pozakomórkowej (RAFFRAY, COHEN, 1997). Produkty rozpadu wyzwalają odpowiedź komórek systemu immunologicznego, których masowa migracja prowadzi do

wystąpienia ostrej reakcji zapalnej i często uszkadza przyległe tkanki. Uruchomienie ścieżki nekrozy może wynikać z obecności endo- lub egzogennych inhibitorów kaspaz czy braku ekspresji tych białek. Stymulację nekrozy przez zahamowanie aktywności kaspaz wywoływano, stosując na przykład promieniowanie czy określone substancje chemiczne (HIRSCH i in., 1997; SANE, BERTRAND, 1999; COELHO i in., 2000). Podobny efekt uzyskiwano w wyniku zastosowania NO, który hamował kaspazę-7 i kaspazę-3, przekierowując komórki ze ścieżki śmierci apoptotycznej na ścieżkę nekrotyczną, pomimo zaawansowanych etapów tej pierwszej (LEIST i in., 1999). Obecnie mało wiadomo na temat, w jaki sposób kaspazy inicjują nekrozę, wydaje się jednak, że ich rola polega na przekazywaniu sygnałów innym proteazom uczestniczącym w tym procesie (PROSKURYAKOV i in., 2003).

Podsumowując, o podjęciu decyzji na temat sposobu śmierci komórki na drodze apoptozy czy nekrozy może decydować poziom stresu oksydacyjnego. Indukcja apoptozy następuje, gdy komórki są w stanie utrzymać swe właściwości redukcyjne względem reaktywnych form tlenu, nekroza zaś zachodzi wówczas, gdy ta homeostaza zostaje zaburzona na przykład w wyniku nadmiernego stresu lub uszkodzenia komórkowych systemów antyoksydacyjnych (PROSKURYAKOV i in., 2003). Wzajemne relacje między elementami obrony antyoksydacyjnej a konsekwencjami stresu ocenianego ilościowymi zmianami komórek apoptotycznych i/lub nekrotycznych mogą stanowić źródło informacji o kondycji metabolicznej narządu, pozwalając przewidywać losy budujących go komórek.

1.3.3. Białka szoku cieplnego (Hsp) oraz metalotioneiny (Mt) jako czynniki antyoksydacyjne i antyapoptotyczne

Szeroko rozumiane białka stresu, w tym białka szoku termicznego (Hsp) (PARCELLIER

i in., 2003) i metalotioneiny (Mt) (SATO, BREMER, 1993; BERNTSSEN i in., 2001; PARK i in., 2001) mogą spełniać funkcję antyoksydacyjną, co wykazano w wielu grupach zwierząt. Indukcja wymienionych białek w warunkach działania określonych czynników stresogennych została udokumentowana u zwierząt zarówno w badaniach laboratoryjnych (BERNTSSEN i in., 2001; PARK i in., 2001; CHABICOVSKY i in., 2004), jak i terenowych (KÖHLER i in., 1999 a; 1999 b; CARPENTER, HOFMANN, 2000; HAMER i in., 2004).

1.3.3.1. Białka szoku cieplnego (Hsp)

Wysoce konserwatywne białka szoku termicznego Hsp w warunkach fizjologicznych funkcjonują jako ATP-zależne cząsteczkowe chaperony, wspomagając fałdowanie nowo zsyntezowanych polipeptydów, składanie kompleksów multiproteinowych i transport białek w poprzek błon biologicznych (VAYSSIER, POLLA, 1998; PARCELLIER i in., 2003) oraz uczestnicząc w procesach proliferacji komórek (HELMBRECHT i in., 2000). Badania prowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* wskazują na zwiększoną produkcję białek Hsp jako wyraz ochrony przed zniszczeniem komórek wywołanym działaniem czynników stresogennych. W odpowiedzi na stres możliwa jest indukcja pięciu dużych klas białek Hsp: 27, 60, 70, 90, 104, a regulacja tego procesu odbywa się na poziomie transkrypcyjnym przez czynniki szoku termicznego (HSF) (SREEDHAR, CSERMELY, 2004). Cytoprotekcyjna funkcja Hsp jest związana z ochroną białek przed denaturacją, reperacją uszkodzeń czy degradacją nieprawidłowo zsyntezowanych polipeptydów (WELCH, 1992).

Niektórzy badacze proponują, aby białka Hsp70 uznać za biomarkery szeroko rozumianego stresu, w tym wywołanego toksycznym oddziaływaniem związków chemicznych. Wzrost ekspresji Hsp70 wykazano m.in. w odpowiedzi na działanie metali (Cd, Pb, Zn), na przykład u *Oniscus asellus* (Isopoda) (ECKWERT i in., 1994; 1997), *Deroceras reticulatum* (Mollusca)

(KÖHLER i in., 1996), *Orchesella bifasciata* i *Tomocerus flavescens* (Collembola) (KÖHLER i in., 1999 a) czy *Eisenia fetida* (Lumbricidae) (REINECKE, REINECKE, 2003). Podobne efekty wywoływały związki organiczne, na przykład pestycydy fosforoorganiczne (chloropirifos) u *D. melanogaster* (Diptera) (NAZIR i in., 2001), benzo *a*-piren czy polichlorowane bifenyle u *Oniscus asellus* (Isopoda) (KÖHLER i in., 1999 b) i u *Julus scandinavicus* (Diplopoda) (ZANGER, KÖHLER, 1996). Stymulację syntezy białek szoku termicznego rejestrowano zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców eksponowanych na podwyższoną temperaturę, na przykład u dżdżownicy *Eisenia fetida* (SANDERS i in., 1994) oraz łososia *Salmo salmar* (SMITH i in., 1999). Głodzenie nie wywierało natomiast wyraźnego stymulującego efektu na syntezę wymienionych białek, na przykład u krocionogów *Julus scandinavicus* (ZANGER, KÖHLER, 1996), roztoczy *Tetranychus urticae* (SHIM i in., 2006), czy myszy (DHAHBI i in., 1997).

Także badania prowadzone na pająkach potwierdzają indukcję białek szoku termicznego w odpowiedzi na naturalne i chemiczne czynniki stresowe. Liczba komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pajaków *A. labyrinthica* i *P. lugubris*, wobec których zastosowano stres łączony (wysoka temperatura i dimetoat), wzrosła prawie 9-krotnie w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Skutki oddzielnego zastosowania stresorów były podobne u obu gatunków, lecz zakres zmian okazał się większy u pajaków sieciowych. W przypadku *A. labyrinthica* był to średnio 5-krotny wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych w odpowiedzi na szok termiczny i blisko 10-krotny wzrost po zastosowaniu pestycydu. Słabsza odpowiedź cechowała reprezentanta pajaków niebudujących sieci (*P. lugubris*), u którego wysoka temperatura powodowała dwukrotny wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych, związek chemiczny zaś wywoływał wzrost blisko 4-krotny (WILCZEK, 2005).

W warunkach stresu indukcja białek Hsp70 jest szybka i odbywa się w przeciągu kilku minut, co udokumentowano m.in. u *D. melanogaster* (LINDQUIST, 1986). Z kolei z badań SMITHA

i in. (1999) wynika, że u łososia *S. salmar* poziom Hsp70 osiągał maksimum po 2 godz. od zadziałania szoku termicznego. Natomiast u małży *Dreissena polymorpha* eksponowanych na Cu taki stan osiągnąć był po 24 godz. i miał tendencję do utrzymywania się (CLAYTON i in., 2000; KAROUNA-RENIER, ZEHR, 2003). Jak wskazują badania prowadzone na *D. melanogaster*, stres zmienia komórkową lokalizację białek Hsp70, których wyższe stężenie notowano głównie w jądrze komórkowym i w jąderku, natomiast po zaprzestaniu działania czynników stresogennych w cytoplazmie, gdzie białka te uczestniczyły w procesach naprawczych (LINGUIST, CRAIG, 1988). Niektórzy autorzy uważają, że najważniejszą funkcją białek Hsp70 podczas stresu jest utrzymanie integralności rybosomów (HARTL, 1996).

Cytoprotekcja indukowana przez Hsp70 może być właściwością związaną z hamowaniem apoptozy (SAMALI, ORRENIUS, 1998). Udokumentowano bowiem liczne powiązania między indukcją syntezy białek szoku termicznego a opornością komórek na ten rodzaj śmierci. Wykazano, że Hsp70 mogą hamować apoptozę wywołaną różnorodnymi czynnikami stymulującymi, na przykład szokiem termicznym, stresem oksydacyjnym, niedotlenieniem czy promieniowaniem UV (JÄÄTTELÄ, 1999). Mechanizm protekcyjny wymienionych białek w odniesieniu do procesów śmierci komórkowej nie został dobrze poznany. W przypadku apoptozy wydaje się, że polega on głównie na usuwaniu niepożądanych i zdenaturowanych białek oraz hamowaniu powstawania reaktywnych form tlenu będących induktorami tego procesu (SAMALI, ORRENIUS, 1998; CARPENTER, HOFMANN, 2000). Potwierdzono udział Hsp70 w przeciwdziałaniu aktywacji kaspaz, jak również w hamowaniu efektów wynikających z działania już aktywnych kaspaz (PARCELLIER i in., 2003). Odbywa się to prawdopodobnie na drodze bezpośredniego oddziaływania Hsp70 z Apaf-1, co przeciwdziała werbowaniu prokaspazy-9 do apoptosomu (BEERE, GREEN, 2001). Hsp70 hamują ponadto uwalnianie cytochromu *c* z mitochondriów i przeciwdziałają zmianom jądrowym, towarzyszącym apoptozie (CREAGH i in., 2000; PARCELLIER i in.,

2003). Ważną funkcją tych białek jest uczestnictwo w utrzymywaniu stężenia ATP na właściwym poziomie, lecz odbywa się to nie na drodze ochrony samego ATP (RADFORD i in., 1996), lecz stabilizacji kompleksów mitochondrialnych, co umożliwia syntezę tego związku (LIN i in., 2001).

Jak wskazują inne badania, Hsp70 mogą również działać ochronnie przeciw nekrozie wywołanej szokiem termicznym, stresem oksydacyjnym czy niedokrwieniem (ANGELIDIS i in., 1991; PLUMIER i in., 1995). Funkcja antynekrotyczna Hsp70 prawdopodobnie wiąże się z hamowaniem kinaz JNK i p38, co opisano w wybranych narządach ssaków w warunkach ich niedokrwienia (MA i in., 1999). Białka Hsp70 powstające w komórkach nekrotycznych przypuszczalnie są ważnym sygnałem dla systemu immunologicznego (MELCHER i in., 1999). Obecnie przypisuje się im rolę immunostymulatora i markera nekrozy (SRIVASTAVA, 2002).

Pomimo niewątpliwej funkcji ochronnej, białka Hsp70 w pewnych warunkach mogą przejawiać negatywne działanie na organizm. W badaniach na ssakach wykazano ich znaczącą rolę w stymulowaniu reakcji autoimmunologicznych. Jako przykład niech posłużą badania nad patologią bielactwa, które wskazują, że podczas nadmiernego stresu białka te dostając się do przestrzeni międzykomórkowej, gdy zostaną przechwycone przez komórki dendrytyczne, wywołują odpowiedź immunologiczną przeciwko sobie. Wykazano ponadto, że opisywane białka mogą zwiększać ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 przez melanocyty (BOSSY, MANGA, 2004). Nadmierna aktywność białek szoku termicznego jest prawdopodobnie przyczyną klinicznych objawów towarzyszących mukowiscydozie. Okazuje się, że mutacja genu kodującego białko CFTR, będące kanałem jonowym komórek nabłonka, nie zmienia w sposób drastyczny transportu jonów przez błonę komórkową. Usuwanie uszkodzonego białka CFTR przez białka opiekuńcze może pogarszać stan kliniczny pacjentów cierpiących na tę chorobę (WICKNER i in., 1999; ELLGARD i in., 1999). Nie bez znaczenia jest również fakt, że Hsp70 jako negatywne regulatory apoptozy mogą warunko-

wać oporność komórek nowotworowych na ten proces. Wykazano, że komórki poddane stresowi termicznemu, pod wpływem którego dochodziło do indukcji białek Hsp70, były odporne na apoptozę indukowaną lekami cytostatycznymi czy promieniowaniem UVC (SAMALI, COTTER, 1996; BEERE, GREEN, 2001; BIELAK-ŻMIJEWSKA, 2003).

1.3.3.2. Metalotioneiny (Mt)

Stres może także skutkować wzmożeniem syntezy metalotionein (Mt) w komórkach. Metalotioneiny to cytosolowe, niskocząsteczkowe (6–7 kD), bogate w cysteinę (30%) białka (DABRIO i in., 2002), których obecność potwierdzono zarówno u kręgowców (YURKOW, DE COSTE, 1999; VASAK, HASLER, 2000), bezkręgowców (HENSBERGEN i in., 2000; CHABICOVSKY i in., 2003; MORGAN i in., 2004), jak i u roślin (ERNST, 1998). Metalotioneiny uczestniczą w homeostazie metali biogennych, na przykład Zn i Cu (MATSUBARA i in., 1986; MASTERS i in., 1994; SUZUKI i in., 2002) oraz w eliminacji metali biologicznie zbędnych, na przykład Cd i Hg (BERGER i in., 1995; HENSBERGEN i in., 2000).

W przypadku kręgowców udokumentowano funkcję ochronną Mt także wobec różnych czynników powodujących stres oksydacyjny, jak: promieniowanie jonizujące (MATSUBARA i in., 1987; KAGI, 1991), hiperoksja (HART i in., 1990) czy określone związki chemiczne, na przykład endotoksyny czy saponiny (ISZARD i in., 1995). Indukcja metalotionein następowała u tych zwierząt przede wszystkim w sytuacji wzrastającego stężenia rodników hydroksylowych, anionorodników ponadtlenkowych oraz rodników organicznych (SATO, BREMNER, 1993). Za antyoksydacyjną funkcję Mt odpowiada prawdopodobnie metionina, której przypisuje się funkcję zmiatacza wolnych rodników tlenowych (THORNALLEY, VASAK, 1985; NORDBERG, 1998). W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, że poziom metalotionein w komórkach HeLa niepoddanych działaniu czynni-

ków stresogennych był niski, jednakże szybko (w przeciągu 1 godz.) podwyższał się, gdy na komórki działano stresorami chemicznymi, na przykład cynkiem czy deksametazonem, i osiągał poziom blisko 10-krotnie wyższy niż w kontroli po 24 godz. od zaprzestania działania czynnika stresogennego (KARIN i in., 1981).

W badaniach na ssakach udokumentowano, że białka te uczestniczą także w modulacji apoptozy. Regulacyjną funkcję Mt wykazano m.in. w izolowanych mitochondriach z komórek wątroby szczurów, u których białka te zwiększały przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdy ich stężenie było niższe niż 50 μ M (SIMPKINS i in., 1998). Z kolei w badaniach prowadzonych na ludzkich liniach komórkowych wykazano, że obniżenie ekspresji Mt hamowało wzrost komórek i inicjowało apoptozę w komórkach nowotworowych (ABDEL-MAGEED, AGRAWAL, 1997; TSANGARIS, TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 1998). Także w komórkach wątroby myszy nasilenie ekspresji Mt indukowało anty-apoptotyczne zmiany, podczas gdy ich brak zwiększał podatność komórek tego narządu na stymulatory śmierci komórkowej (KONDO i in., 1997). Wykazano ponadto, że indukcji syntezy Mt u szczurów pod wpływem działania związków chemicznych, np. stylobenu (trans-1,2-dwufenyloetylen) też towarzyszyło obniżenie stężenia GSH (SATO i in., 1995), co mogło być sygnałem sprzyjającym śmierci komórek (MACHO i in., 1997; TAN i in., 1998).

W przypadku bezkręgowców lądowych szczególnie dobrze udokumentowano funkcje ochronne metalotionein wobec metali, m.in. w przypadku muszki *D. melanogaster* (MARONI, WATSON, 1987), ślimaków, na przykład *H. pomatia*, *Arianta arbustorum* (DALLINGER, 1993; CHABICOVSKI i in., 2004), dżdżownic *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* (STÜRZENBAUM i in., 1998; MORGAN i in., 2004) czy skoczogonków *Orchesella cincta* (HENSBERGEN i in., 2000). W przypadku bezkręgowców wodnych dane takie zgromadzono na przykład dla skorupiaków *Carcinus maenas* (PEDERSEN i in., 1998) czy małży *Littorina littorea* (BEBBIANO i in., 1992). Wykazano na przykład, że w kolejnych pokoleniach muszki *D. melanogaster* narażonych na

wysokie stężenia metali mogą się pojawiać osobniki o zduplikowanym genie kodującym te białka (MARONI i in., 1987).

Nieliczne dane zgromadzono na temat indukcji metalotionein w odpowiedzi na różne czynniki stresowe także dla pajaków. Liczba komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica*, *L. triangularis* i *X. nemoralis* zebranych na stanowisku silnie zanieczyszczonym metalami (Olkusz) była największa u pierwszego z wymienionych gatunków. Ponadto obie płci *X. nemoralis* miały podobny odsetek komórek Mt pozytywnych, gdy tymczasem u samic *A. labyrinthica* był on blisko 70% wyższy niż u samców, u samców *L. triangularis* zaś o ponad 80% wyższy niż u samic (WILCZEK i in., 2007). Gdy samice *P. lugubris* i *A. labyrinthica* eksponowano w laboratorium na czynniki stresowe: wysoką temperaturę i/lub pestycyd fosforoorganiczny (dimetoat), liczba komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego u obu gatunków wzrastała (WILCZEK, 2005). Najwyższy procent komórek Mt pozytywnych miały *P. lugubris* z grup poddanych stresowi dwóch czynników łącznie. W cytowanej pracy wykazano dodatnie korelacje między liczbą komórek Mt pozytywnych i liczbą komórek apoptotycznych oraz liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego samic obu gatunków. Podobne zależności stwierdzono między liczbą komórek Mt

i Hsp70 pozytywnych w analizowanym narządzie obu gatunków pajaków (WILCZEK, 2005).

Z uwagi na niedostateczność informacji na temat komórkowych reakcji na stres u pajaków w pracy tej skoncentrowano się na ocenie stopnia nasilenia procesów śmierci komórkowej (apoptozy/nekrozy), enzymatycznych i nieenzymatycznych parametrach wskazujących na skuteczność obrony antyoksydacyjnej, w tym poziomie białek stresu (metalotioneiny, Hsp70) w gruczołach jelita środkowego samic i samców dwóch behawioralnie i biologicznie zróżnicowanych gatunków poddanych w warunkach laboratoryjnych działaniu stresorów naturalnych i antropogennych. Porównanie poziomu analizowanych parametrów u osobników pochodzących z terenów w różnym stopniu zanieczyszczonych metalami ciężkimi pozwoliłoby zidentyfikować i ocenić wybór realizowanych strategii kompensacyjnych/adaptacyjnych, podejmowanych przez pajaki wobec nagle pojawiających się dodatkowych czynników stresogennych. Uzyskane wyniki mogą się okazać pomocne w zweryfikowaniu zastosowanych wskaźników jako biomarkerów ekspozycji pajaków jako reprezentantów drobnych drapieżników lądowych na zanieczyszczenia. Powinny dać podstawę do wnioskowania na temat możliwości adaptacyjnych pajaków do funkcjonowania na terenach zanieczyszczonych.

2. Cele pracy

Organizmy żyjące w ekosystemach antropogenicznie zmienionych mogą wykazywać odmienne reakcje metaboliczne w odpowiedzi na nagle pojawiające się dodatkowe czynniki stresowe, w porównaniu z takimi, które charakteryzują osobniki pochodzące z ekosystemów naturalnych. Zasadniczym celem pracy było:

1. Porównanie komórkowych efektów działania stresorów naturalnych (wysoka temperatura, brak pokarmu) i antropogenicznego (pestycyd fosforoorganiczny) u dwóch behawioralnie zróżnicowanych gatunków pajaków: sieciowego *Agelena labyrinthica* i niebudującego sieci *Xerolycosa nemoralis*, pochodzących z terenów w różnym stopniu zanieczyszczonych, w tym szczególnie metalami ciężkimi.
2. Wykazanie, który z czynników stresowych stanowi największe obciążenie dla analizowanych gatunków pajaków.
3. Sprawdzenie, czy samice i samce pajaków, które w warunkach naturalnych są chronicznie intoksykowane metalami ciężkimi, w porównaniu z osobnikami z terenu referencyjnego w podobnym stopniu reagują na dodatkowe stresory.

Wybór analizowanych parametrów biochemicznych podyktowany był faktem ich istotnego znaczenia jako biomarkerów stresu wywołanego działaniem czynników antropogenicznych i naturalnych. Uznając strategiczną rolę gruczołów jelita środkowego w procesach trawienia i detoksykacji, analizę wybranych parametrów komórkowych ograniczono do tego narządu.

Uwzględniając przedstawione wcześniej problemy, sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- H_{1,0}:** Zastosowane czynniki stresogenne wywołują podobne zmiany w gruczołach jelita środkowego badanych gatunków, czyli że ich charakter nie decyduje o skali zmian wartości wskaźników śmierci komórkowej, białek stresu i enzymatycznych parametrów antyoksydacyjnych.
- H_{1,1}:** Wrażliwość na zadane czynniki stresogenne jest odmienna u obu gatunków, gdyż ilościowe zmiany komórek apoptotycznych i nekrotycznych oraz poziom wybranych parametrów antyoksydacyjnych zależą od charakteru zastosowanego czynnika.
- H_{2,0}:** Efekty metaboliczne działania wybranych czynników stresogennych są podobne u samic i samców obu gatunków pajaków, niezależnie od stopnia zanieczyszczenia ekosystemów, skąd pochodziły zwierzęta. Oznacza to, że nie ma różnic między płciami u obu gatunków w odniesieniu do analizowanych wskaźników śmierci komórkowej, białek stresu i enzymatycznych parametrów antyoksydacyjnych.
- H_{2,1}:** Samce cechuje większa wrażliwość na pojawienie się dodatkowego czynnika stresowego niż samice, niezależnie od stopnia preekspozycji na zanieczyszczenia. Przejawem tego jest u nich większe nasilenie zmian nekrotycznych i apopto-

tycznych w gruczołach jelita środkowego i słaba obrona antyoksydacyjna.

H_{2,2}: Dodatkowe czynniki stresogenne wpływają tylko na samice obu gatunków z terenów zanieczyszczonych, czego wyrazem jest u nich zmiana poziomu wskaźników śmierci komórkowej i obrony antyoksydacyjnej.

H_{3,0}: Czynniki stresogenne nie zmieniają liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych, jak również parametrów antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego obu gatunków pajaków, niezależnie od stopnia preekspozycji na metale ciężkie.

H_{3,1}: Chroniczny kontakt z metalami różnicuje odpowiedzi metaboliczne obu gatunków pajaków. Oznacza to, że reakcją osobników pochodzących z terenów silnie zanieczyszczonych na dodatkowe czynniki stresogenne są zmiany zarówno poziomu wskaźników śmierci komórkowej, jak i/lub parametrów antyoksydacyjnych.

H_{3,2}: Preekspozycja na zanieczyszczenia w środowisku pajaków różnicuje odpowiedzi metaboliczne tylko u jednego gatunku. Mniejszy zakres zmian nekrotycznych i nasilenie obrony antyoksydacyjnej wskazuje na jego większą oporność na zastosowane czynniki stresowe, gdyż dysponuje sprawniejszymi mechanizmami adaptacyjnymi w sytuacji nagle pojawiających się niekorzystnych stresorów.

H_{4,0}: Nie ma zależności między liczbą komórek ulegających śmierci komórkowej na drodze apoptozy lub nekrozy a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych oraz indukcją białek stresu u pajaków eksponowanych na zastosowane czynniki stresowe niezależnie od ich charakteru.

H_{4,1}: Liczba komórek ulegających śmierci komórkowej i aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz stopień indukcji białek stresu w warunkach oddziaływania dodatkowego stresora pozostają we wzajemnych zależnościach, a zmiany te są związane z przynależnością gatunkową.

W celu wykazania, czy u pajaków rzeczywiście zachodzi zależność między mechanizmami śmierci komórkowej a stresem oksydacyjnym i jaki one mają charakter, w gruczołach jelita środkowego pajaków, które poddano krótkotrwałej ekspozycji na działanie czynników prooksydacyjnych o różnym charakterze, oddziałujących pojedynczo (szok termiczny, pestycyd, głodzenie) i w kombinacjach (szok termiczny i pestycyd), oceniano następujące parametry:

1. Stopień nasilenia zmian apoptotycznych i nekrotycznych, a także ilościowe zmiany komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami oraz poziom aktywności proteazy kaspazopodobnej (Cas-3).
2. Ilościowe zmiany komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałami dla białek stresu: Hsp70 i metalotionein (Mt) w odpowiedzi na zastosowane stresory.
3. Poziom wybranych parametrów antyoksydacyjnych (stężenie glutationu całkowitego, aktywność selenozależnej peroksydazy glutationowej, peroksydazy glutationowej niezależnej od selenu, S-transferazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy) oraz ich relacje do ilościowych zmian wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu.

Realizację zadań badawczych z pkt. 1. i 2. oparto na technikach cytometrycznych (*flow cytometry*), które powszechnie stosuje się w badaniach na kręgowcach, głównie ssakach, natomiast rzadko korzysta się z nich w badaniach na bezkręgowcach.

W tym celu na potrzeby badań cytometrycznych zoptymalizowano metody izolacji komórek gruczołów jelita środkowego pajaków, przystosowano też metodycznie wymienioną technikę do ilościowej oceny komórek ginących na drodze apoptozy lub nekrozy w analizowanym narządzie pajaków. Technika cytometrii przepływowej rejestrowano ponadto ilościowe zmiany komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałami dla metalotionein i Hsp70. Enzymatyczne odpowiedzi antyoksydacyjne (pkt 3) badano metodami spektrofotometrycznymi.

3. Materiał i metody

3.1. Teren badań

Pająki odławiano na dwóch stanowiskach łąkowych. Pierwsze, silnie zanieczyszczone metalami, jest zlokalizowane w zachodniej części Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej, w okolicach Olkusza (50°17' N, 19°34' E; województwo małopolskie, gmina Olkusz), w odległości 3,5 km od Zakładów Górniczo-Hutniczych „Bolesław”, stanowiących kompleks wydobywczo-przetwórczy, którego podstawową działalnością jest wydobycie rud cynku i ołowiu, produkcja cynku elektrolitycznego, koncentratów cynkowo-olowiowych, stopów ocynkowniczych i odlewniczych oraz kwasu siarkowego. Z uwagi na boga-

Analiza zawartości metali w ściółce pochodzącej ze stanowiska silnie zanieczyszczonego (Olkusz) ujawniła ponad 4-krotnie wyższe stężenia Cu, 20-krotne w przypadku Pb, 70-krotne w przypadku Zn i aż 100-krotne w przypadku Cd w stosunku do wartości notowanych w takiej samej warstwie podłoża ze stanowiska referencyjnego. Wysoki poziom pierwiastków w powierzchniowych warstwach podłoża jest wynikiem zarówno naturalnie występujących dolomitów kruszczośnych o wysokiej zawartości metali i nakładającej się działalności człowieka. Średnie stężenia metali w ściółce pochodzącej z analizowanych stanowisk zaprezentowano w tabeli 3.1.

Tabela 3.1

Średnie stężenie metali ($\mu\text{g} \cdot \text{g}$ suchej masy⁻¹) $\pm$ odchylenie standardowe (SD) w warstwie humusu w Olkuszu i w Pilicy (STONE i in., 2001; 2002)

Materiał	Stanowisko	Cd	Pb	Cu	Zn
Humus	Olkusz	82 $\pm$ 17,2	2 635 $\pm$ 120	47 $\pm$ 4,6	10 454 $\pm$ 2 618
	Pilica	0,84 $\pm$ 0,4	136 $\pm$ 8,8	10,7 $\pm$ 1,0	151 $\pm$ 35

te złoża rud cynkowo-olowiowych stanowisko to charakteryzuje naturalnie wysoka zawartość metali ciężkich w podłożu. Drugie stanowisko, traktowane jako referencyjne, jest zlokalizowane na Wyżynie Ryczkowskiej, w okolicy miejscowości Sierbowice, w gminie Pilica (50°28' N, 19°39' E, województwo śląskie). Stanowisko to jest położone z dala od większych zakładów przemysłowych (30 km od ZGH „Bolesław”).

3.2. Charakterystyka badanych gatunków pająków

Badania przeprowadzono na dorosłych samicach i samcach dwóch gatunków pająków: *Agelena labyrinthica* (CLERCK, 1757) (Agelenidae) oraz *Xerolycosa nemoralis* (WESTRING, 1861) (Lycosidae). Oba gatunki reprezentują faunę epi-

geiczną, lecz różnią się odmiennym trybem życia, aktywnością łowiecką oraz strategią zdobywania ofiar (HALLANDER, 1970; EDGAR, 1970; PUNDA, 1975; NENTWIG, 1983; VAROL i in., 2006). Główne różnice w ich biologii i behaviorze zestawiono w tabeli 3.2.

Analizowane gatunki różnią się także zdolnością przyswajania metali. Stężenia czterech metali w gruczołach jelita środkowego samic i samców pajaków odławianych na wymienio-nych stanowiskach zostały zestawione w ta-
bli 3.3.

Tabela 3.2

Charakterystyka analizowanych gatunków pajaków

Cechy		
	<i>Agelena labyrinthica</i>	<i>Xerolycosa nemoralis</i>
Pochodzenie	palearktyczny	palearktyczny
Rozmiary ciała	♀ 8,0—12,0 mm, ♂ 8,0—9,0 mm	♀ 4,5—7,5 mm, ♂ 4,5—6,0 mm
Długość życia	jednoroczne, dojrzałe płciowo osobniki spotyka się w lipcu i w sierpniu	jednoroczne, dojrzałe płciowo osobniki spotyka się w maju i w czerwcu
Środowisko	murawy kserotermiczne, nasłonecznione łąki oraz obrzeża lasu	murawy kserotermiczne, kamieniste zbocza, nasłonecznione łąki, lasy
Strategia polowania	lejkowate sieci łowne budowane tuż przy podłożu	nie buduje sieci, poluje, odbierając drgania podłoża wywołane ruchami ofiary
Aktywność drapieżnicza	zwykle czatuje na ofiarę przy wejściu do lejkowatej sieci	ruchliwe, aktywnie poszukujące ofiary
Odławiane ofiary	Coleoptera, Hymenoptera, Brachycera, w mniejszym stopniu Nematocera, Aphidoidea, Lepidoptera	larwy Diptera, Collembola, rzadziej Coleoptera i Hymenoptera

Tabela 3.3

Średnie stężenie metali ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy $\pm$ odchylenie standardowe; SD, $n = 6$) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *Agelena labyrinthica* (A. l.) i *Xerolycosa nemoralis* (X. n.) zebranych z dwóch stanowisk

Stanowisko	Gatunek	Cd	Pb	Cu	Zn
Olkusz	A. l. F	75,6 $\pm$ 15,8 ^a	19,6 $\pm$ 7,7 ^a	66,5 $\pm$ 17,4 ^a	2 432 $\pm$ 282 ^a
	A. l. M	140,5 $\pm$ 24,2 ^b	14,4 $\pm$ 1,6 ^a	166,3 $\pm$ 18,8 ^b	5 329 $\pm$ 795 ^b
Pilica	A. l. F	31,5 $\pm$ 11,4 ^a	17,8 $\pm$ 8,6 ^a	36,3 $\pm$ 9,9 ^a	831 $\pm$ 80 ^a
	A. l. M	27,0 $\pm$ 9,2 ^a	5,8 $\pm$ 1,7 ^b	72,5 $\pm$ 10,2 ^b	1 464 $\pm$ 102 ^b
Olkusz	X. n. F	51,3 $\pm$ 15,8 ^a	49,9 $\pm$ 16,2 ^a	42,2 $\pm$ 7,8 ^a	2 264 $\pm$ 439 ^a
	X. n. M	107,4 $\pm$ 6,4 ^b	30,7 $\pm$ 3,0 ^b	300,5 $\pm$ 24,8 ^b	5 362 $\pm$ 872 ^b
Pilica	X. n. F	23,4 $\pm$ 4,5 ^a	12,0 $\pm$ 8,0 ^a	95,8 $\pm$ 33,2 ^a	1 650 $\pm$ 193 ^a
	X. n. M	45,5 $\pm$ 3,3 ^b	14,0 $\pm$ 3,5 ^a	169,7 $\pm$ 36,7 ^b	4 453 $\pm$ 767 ^b

Objaśnienia: ^a, ^b — grupy heterogenne w obrębie gatunku i stanowiska ($p < 0,05$) (WILCZEK i in., 2007).

3.3. Grupy doświadczalne i stosowane czynniki stresowe

Pająki obu płci analizowanych gatunków odławiano ręcznie, metodą na upatrzonego, bezpośrednio do szklanych probówek, w okresie od maja do sierpnia w latach 2004—2006, zgodnie z kolejnością pojawiania się postaci dorosłych (tabela 3.2). W laboratorium pająki przetrzymywano w plastikowych pojemnikach, w komorach hodowlanych mających standardowe warunki oświetlenia (14 L : 10 D), temperatury (L : 25°C, D : 15°C) i wilgotności (70 ± 10%). Pająki karmiono codziennie larwami II i III stadium świerszcza domowego *Acheta domestica*, pochodzącymi z hodowli prowadzonej w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii. Pająki ze wszystkich grup eksperymentalnych otrzymywały też wodę do picia.

W laboratorium pająki poddawano działaniu czynników stresogennych o charakterze naturalnym (T — wysoka temperatura, G — głodzenie) i antropogennym (P — insektycyd fosforoorganiczny), działających pojedynczo i w kombinacji podwójnej (T + P — temperatura i insektycyd), wyróżniając łącznie 4 główne grupy doświadczalne oraz kontrolę. Dobór czynników stresowych oraz stopień ich nasilenia odzwierciedlały potencjalne zagrożenia, z którymi mogą się spotkać te drapieżniki w swym naturalnym środowisku życia. Szczegółową charakterystykę grup doświadczalnych przedstawiono na ryc. 3.1.

Układ schematów obrazujących wyszczególnione grupy doświadczalne koresponduje ze sposobem graficznej prezentacji rezultatów badań dla poszczególnych grup w rozdziale 4 (Wyniki). Dla uproszczenia, aby nie nadużywać terminu „stanowisko”, w tekście wymienionego rozdziału zastosowano skrót: „samce/samice z Pilicy/Olkusza”, określający osobniki odłowione na stanowisku w Olkuszu lub w Pilicy.

Doboru warunków termicznych dokonano na podstawie danych literaturowych (PULZ, 1987; SCHMALHOFER, 1999), a także doświadczeń własnych (WILCZEK, 2005). Górna temperatura letalna dla przedstawicieli rodziny Agelenidae wynosi 45°C (temperatura preferowana to

23,5°C), a dla przedstawicieli rodziny Lycosidae wartości te mieszczą się w zakresie 35—48°C, temperatura preferowana to 26°C (PULZ, 1987; SCHMALHOFER, 1999). Uwzględniając wartości krytycznej temperatury maksymalnej (CT_{max}), czyli najwyższej temperatury, w której zwierzę zachowuje zdolność do poruszania się, pająki z grupy T poddawano 5-minutowej ekspozycji w 42°C (*A. labyrinthica*) i w 45°C (*X. nemo-ralis*) (SCHMALHOFER, 1999) przez pięć dni w 24-godzinnym interwale czasowym. Szok termiczny stosowano zawsze o godzinie 11⁰⁰. Nie stwierdzono zwiększenia śmiertelności osobników w porównaniu z grupą kontrolną.

W niniejszych badaniach zastosowano dime-toat (ditiofosforan *O,O*-dimetylo-S-metylokarbamoilometylu), który jest układowym i kontaktowym insektycydem fosforoorganicznym, inhibitorem cholinesterazy o szerokim spektrum działania (WHO, 1989; TIMBRELL, 1992). Związek ten dobrze się rozpuszcza w wodzie i w rozpuszczalnikach organicznych (WALKER i in., 2002). Stosuje się go w uprawach polnych i zielarskich w postaci oprysków lub do podlewania roślin w dawkach 0,24—0,9 kg · ha⁻¹. W pracy wykorzystano gotowy preparat Bi_R58 (Bayer) zawierający 400 g substancji czynnej · l⁻¹, który rozcieńczano w odpowiedniej objętości wody destylowanej, aby uzyskać wymagane stężenie substancji czynnej (ryc. 3.1).

Ponieważ dimetoat nie jest stosowany bezpośrednio przeciwko pająkom, bezkręgowce te ze względu na miejsce występowania mogą być zatrutowane w sposób przypadkowy. Dlatego w pracy zastosowano niskie dawki wymienionego związku, aby sprawdzić, czy i w jaki sposób kontakt pająków z subletalnymi dawkami insektycydu fosforoorganicznego zmienia odpowiedź komórkową i biochemiczną w ich gruczołach jelita środkowego. Uwzględniając okres zachowania przez dimetoat aktywności toksycznej po zastosowaniu go na polach uprawnych, sięgający 2—3 tygodni, w pracy stosowano pięciokrotną aplikację wymienionego związku, wychodząc z założenia, że w warunkach naturalnych możliwy jest chroniczny kontakt pająków z tego typu substancjami. Dimetoat podawano pająkom kontaktowo, nakrapiając codziennie przez 5 dni na

Agelena labyrinthica

Pilica	A 1 μl H_2O /osob. przez 5 dni	B 42°C; 5 min przez 5 dni	C 0,16 μg /osob. przez 5 dni	D 42°C; 5 min; + 0,16 μg /osob. przez 5 dni	E 14 dni
	F 1 μl H_2O /osob. przez 5 dni	G 42°C; 5 min przez 5 dni	H 0,16 μg /osob. przez 5 dni	I 42°C; 5 min; + 0,16 μg /osob. przez 5 dni	J 14 dni
Olkusz	F M	F M	F M	F M	F M
	K	T	P	T+P	G

Xerolycosa nemoralis

Pilica	A 1 μl H_2O /osob. przez 5 dni	B 45°C; 5 min przez 5 dni	C 0,16 μg /osob. przez 5 dni	D 45°C; 5 min; + 0,16 μg /osob. przez 5 dni	E 14 dni
	F 1 μl H_2O /osob. przez 5 dni	G 45°C; 5 min przez 5 dni	H 0,16 μg /osob. przez 5 dni	I 45°C; 5 min; + 0,16 μg /osob. przez 5 dni	J 14 dni
Olkusz	F M	F M	F M	F M	F M
	K	T	P	T+P	G

Ryc. 3.1. Charakterystyka grup doświadczalnych

K — kontrola (A, F), T — szok termiczny (B, G), P — pestycyd (C, H), T + P — szok termiczny i pestycyd (D, I); G — głodzenie (E, J), F — samice, M — samce

grzbietową stronę głowotułowia 1 μl roztworu zawierającego 0,16 μg substancji czynnej/osobnika. Wcześniejsze badania, w których pająkom *Pardosa lugubris* (Lycosidae) preparat ten aplikowano w podobny sposób i w podobnym stężeniu, wskazują, że podczas eksperymentu trwającego 5 dni śmiertelność po 5 dniach wynosiła 5%, a w przypadku *A. labyrinthica* było to 8%.

Śmiertelność w odpowiednich grupach kontrolnych obu gatunków pajaków wynosiła 5% (WILCZEK, 2005). Zastosowane w niniejszym eksperymencie stężenie dimetoatu w jednorazowym podaniu było blisko 4-krotnie niższe od dawki LD50 (dla 48 godz.) wynoszącej dla *Pardosa prativaga* (Lycosidae) 0,60 μg /osobnika w ekspozycji kontaktowej (PEDERSEN i in., 2002) oraz 15-krotnie niższe od dawki LD50 (dla 24

godz.), która dla innego przedstawiciela pogońcowatych, jakim jest *Pardosa amentata*, wynosiła 2,5 µg/osobnika (TOFT, JENSEN, 1998). Ponieważ rozpuszczalnikiem substancji czynnej pestycydu była woda, osobnikom grupy kontrolnej nakrapiano na grzbietową stronę głowotułowia 1 µl wody, jednorazowo w ciągu doby, przez 5 dni.

Pająki z grupy (T + P) poddano łącznemu działaniu szoku termicznego i dimetoatu w nasileniu podobnym jak w grupach traktowanych pojedynczymi stresorami. W każdym przypadku zachowywano tę samą kolejność ekspozycji na czynniki stresogenne, w pierwszej kolejności poddając pająki działaniu wysokiej temperatury, a następnie aplikując pestycyd.

Pająki z grupy G przez 14 dni nie otrzymywały pokarmu, lecz podobnie jak pająki z innych grup eksperymentalnych miały nieograniczony dostęp do wody. Długość okresu głodzenia wybrano w sposób losowy, przyjmując, że jest on prawdopodobny w warunkach naturalnych, zwłaszcza w sytuacji, gdy o aktywności drapieżniczej tych bezkręgowców decydują warunki pogodowe.

3.4. Charakterystyka gruczołów jelita środkowego pajaków

Gruczoły jelita środkowego pajaków są zlokalizowane w opistosomie, otaczając narządy wewnętrzne, m.in. gruczoły przedne i gonady. Część tego narządu może także występować w prosomie, a nawet w części głowowej, co jest charakterystyczne dla przedstawicieli rodziny Salticidae. Tak silne rozbudowanie wymienionego narządu w organizmie niektórych gatunków może tłumaczyć ich małą wrażliwość na niedobory pożywienia (FOELIX, 1996). Narząd ten składa się z rozgałęzionego systemu ślepo zakończonych zatok (*diverticula*), zespolonych tzw. tkanką pośrednią. Ściany zatok buduje dymorficzne *epithelium* składające się głównie z komórek trawiennych i sekrecyjnych (LUDWIG, ALBERTI, 1988b; LUDWIG, ALBERTI, 1992). Zda-

niem niektórych badaczy, w narządzie tym mogą dodatkowo występować tzw. komórki podstawne, które prawdopodobnie stanowią nie zróżnicowane komórki, mogące się przekształcać w komórki trawienne lub sekrecyjne (COLLATZ, 1987; LIPOVŠEK i in., 2004). W niektórych opracowaniach pojawiają się też informacje o obecności guanocytów, wyspecjalizowanych komórek resorpcyjnych, biorących udział w metabolizmie m.in. związków purynowych, których zadaniem jest gromadzenie kryształków guaniny (FOELIX, 1996).

Komórki trawienne, zwykle kształtu kulistego, w części apikalnej mają dobrze rozwinięty rąbek szczoteczkowy z długimi palczastymi wypustkami sięgającymi w głąb tkanki pośredniej. Pojedyncze jądro komórkowe o kształcie okrągłym lub owalnym zwykle jest zlokalizowane przypodstawnie. Często jego kształt jest zdeformowany na skutek obecności wakuol trawiennych, których wielkość zależy od stanu odżywienia danego osobnika. Także obecność i rozmieszczenie kropeł lipidów i glikogenu w cytoplazmie jest uwarunkowana dostępnością pokarmu. Jądro ma jedno, rzadziej dwa jąderka. Komórki trawienne zawierają tylko szorstkie retikulum endoplazmatyczne, którego cysterny są krótkie i nie tak liczne, jak w komórkach sekrecyjnych. Aparat Golgiego oraz mitochondria są rozlokowane równomiernie w całej komórce. Czasem w cytoplazmie można rozróżnić struktury mielinopodobne, będące produktami rozpadu błon związanymi z systemem lizosomalnym (COLLATZ, 1987; LUDWIG, ALBERTI, 1988 a).

W komórkach trawiennych często stwierdza się także obecność struktur określanych mianem „okresowe sferyty” (LUDWIG, ALBERTI, 1988 a) lub granule (HOPKIN, 1989). Struktury te występują przypodstawnie, w grupach liczących od kilku do nawet 50. Mają kształt owalny, średnicę 1—6 µm, w przeważającej większości są zbudowane z fosforanu wapnia, aczkolwiek, w zależności od typu, mogą zawierać także inne pierwiastki, co zostało opisane w części wstępnej niniejszej pracy. Mniej liczne inkluzje to tzw. ciała sierpowate zawierające kryształki zbudowane z soli wapnia (LUDWIG, ALBERTI, 1988 a).

Drugi typ komórek to komórki sekrecyjne, zwykle mniejsze od trawiennych, o kształcie eliptycznym, mające zbitą cytoplazmę. Główną cechą odróżniającą je od komórek trawiennych jest brak apikalnego systemu mikrofilamentów, a rąbek szczoteczkowy nie jest tak regularny jak w przypadku komórek trawiennych (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b; LUDWIG, ALBERTI, 1992). Jądro komórkowe ma budowę podobną do jądra w komórkach trawiennych, jednak zazwyczaj jego osłonka jądrowa ma duże pory. Szorstkie retikulum endoplazmatyczne jest bardzo dobrze rozwinięte i zlokalizowane zwykle wokół jądra. W sąsiedztwie retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego obserwuje się liczne granule sekrecyjne, które, jak się przypuszcza, zawierają enzymy trawienne (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b). Komórki sekrecyjne mogą też zawierać sferyty, które jednak skupiają się w mniej liczne grupy (maksymalnie do 10) (LUDWIG, ALBERTI, 1988 a; 1988 b).

Tkanka pośrednia wypełniająca przestrzeń między zatokami *diverticula* jest pochodzenia mezodermalnego. Charakteryzuje ją obecność dużej ilości substancji zapasowych, takich jak tłuszcze i glikogen, zwłaszcza bezpośrednio po spożyciu pokarmu. Wskazuje to na magazynującą funkcję tej tkanki. Mitochondria i szorstkie retikulum endoplazmatyczne są w niej rozmieszczone równomiernie, natomiast sferyty nie występują (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b). Uważa się, że tkanka pośrednia pajęczaków jest homologiczna z ciałem tłuszczowym owadów. Te gatunki, u których tkanka pośrednia jest słabo rozwinięta, mogą żyć bez jedzenia zaledwie kilka dni (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b).

Brak jest jednoznacznych opinii na temat regeneracji i różnicowania się komórek gruczołów jelita środkowego pajaków. W narządzie tym u dorosłych osobników *Coelotes terrestris* (Agelenidae) nie obserwowano żadnych stadiów podziału komórkowego. Nie jest wykluczone, że komórki trawienne są zastępowane komórkami glikogenowymi, podczas gdy komórki sekrecyjne, po opróżnieniu enzymów, są zamieniane w komórki trawienne (ALBERTI, STORCH, 1983).

Gruczoły jelita środkowego pajaków uczestniczą w procesach trawienia, magazynowania

i detoksykacji. Pierwsza z wymienionych funkcji wiąże się z produkcją enzymów trawiennych uczestniczących w trawieniu zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym. W składzie mieszaniny trawiennej wydzielanej podczas trawienia zewnątrzkomórkowego przez *Tegenaria atrica* (Agelenidae) znajdowano głównie: α -amylazy, karboksypeptydazę A, lipazę, chitynazę oraz wiele niespecyficznych esteraz (MOMMSEN, 1977). W gruczołach jelita środkowego *Coelotes terrestris* (Agelenidae) największą aktywność niespecyficznej esterazy znajdowano w komórkach trawiennych *epithelium* oraz w tkance pośredniej w okolicach cewek Malpighiego. Enzymem obecnym w tym narządzie jest także alkaliczna fosfataza, której wysoką aktywność stwierdzono w tkance pośredniej, szczególnie w okolicach cewek Malpighiego, podczas gdy w komórkach *epithelium* jej aktywność jest znikoma. Nie potwierdzono natomiast u pajaków obecności fosfatazy kwaśnej, chociaż enzym często występuje u innych pajęczaków. Z kolei aminopeptydaza wykazuje aktywność w wakuolach trawiennych i cewkach Malpighiego oraz wewnątrz sferytów (LUDWIG, ALBERTI, 1988 b).

Gruczoły jelita środkowego gromadzą tłuszcze i glikogen, głównie w komórkach trawiennych oraz w tkance pośredniej, co jest jednym z mechanizmów adaptacyjnych tej grupy drapieżnych bezkręgowców do przeżywania długotrwałych okresów głodu. Z zapasów pajaki korzystają jednak bardzo ekonomicznie, dzięki obniżeniu tempa przemian metabolicznych (ANDERSON, 1970; COLLATZ, MOMMSEN, 1975).

Funkcja detoksykacyjna opiera się głównie na magazynowaniu metali w granulach komórek trawiennych i w mniejszym stopniu sekrecyjnych (BROWN, 1982; HOPKIN, 1989). Wysoka aktywność takich enzymów detoksykacyjnych jak: SOD, CAT, GPOX, GSTPx, CarE w tym narządzie u pajaków z terenów silnie zanieczyszczonych, w odniesieniu do pajaków pochodzących z terenów nieskażonych, może wskazywać także na znaczący udział gruczołów jelita środkowego w enzymatycznej neutralizacji wielu substancji organicznych (BABCZYŃSKA i in., 2006; WILCZEK i in., 2007).

3.5. Analizy cytometryczne i spektrofotometryczne

Osobniki z grup T, P oraz T + P po 24 godz. od ostatniej ekspozycji na wymienione czynniki stresowe, jak również pająki z grupy G po 14 dniach głodzenia usypiano na lodzie, po czym z opistosomy izolowano gruczoły jelita środkowego. Zarówno w przypadku analiz cytometrycznych, jak i spektrofotometrycznych jedną próbę gruczołów jelita środkowego stanowił materiał z 1—2 osobników w przypadku *A. labyrinthica* (średnia masa materiału z jednego osobnika wynosiła 60 mg) i 2—3 osobników w przypadku *X. nemoralis* (średnia masa materiału z jednego osobnika wynosiła 20 mg). Dla każdej grupy doświadczalnej przygotowano 5—6 powtórzeń. Sposób dalszego przygotowania materiału biologicznego zależał od wymogów danej metody.

3.5.1. Wskaźniki śmierci komórkowej i białka stresu

3.5.1.1. Przygotowanie materiału do analiz cytometrycznych

Materiał przeznaczony do analiz cytometrycznych poddano procedurze izolacji komórek. W przypadku *A. labyrinthica* jedną próbę stanowiły gruczoły jelita środkowego pochodzące od 1 osobnika, a w przypadku *X. nemoralis* od 2 osobników. Wypreparowane narządy homogenizowano w buforze fosforanowym PBS o pH 7,4 ręcznym homogenizatorem. Homogenat wirowano w 250 g przez 5 min. Do precypitatu dodawano 1% roztworu dyspazy (około 0,4 jednostki $\cdot$ mg⁻¹) w buforze PBS i inkubowano przez 15 min w temperaturze 25°C, delikatnie mieszając. Uzyskaną zawiesinę komórek płukano przez odwirowanie w 250 g przez 5 min,

a otrzymany precypitat zawieszano w 500 μ l buforu PBS i oceniano przeżywalność komórek. W tym celu użyto dwóch barwników: dwuocianu fluoresceiny (FDA) w stężeniu wyjściowym 1 mg FDA $\cdot$ ml⁻¹ acetonu i jodku propidyny (PI; min. 95%) w stężeniu wyjściowym 1 mg PI $\cdot$ ml⁻¹ wody destylowanej. PI znakuje komórki martwe, penetrując do komórki przez uszkodzoną błonę komórkową (czerwona fluorescencja), podczas gdy FDA pokonuje nienaruszoną błonę, po czym zostaje rozłożony przez niespecyficzne esterazy na monomery o wysokiej polarności, zyskując cechy fluorescencji. Produkty tej reakcji znakują komórki żywe przez wzbudzenie zielonej fluorescencji. Komórki wykazujące fluorescencję czerwoną lub jednocześnie zieloną i czerwoną, klasyfikowano jako martwe (ORMEROD, 1990; WILCZEK i in., 1996). Analizę żywotności komórek przeprowadzono z użyciem cytometru przepływowego Coulter Instrument EPICS XL MLC z laserem argonowym, przy długości fali 488 nm.

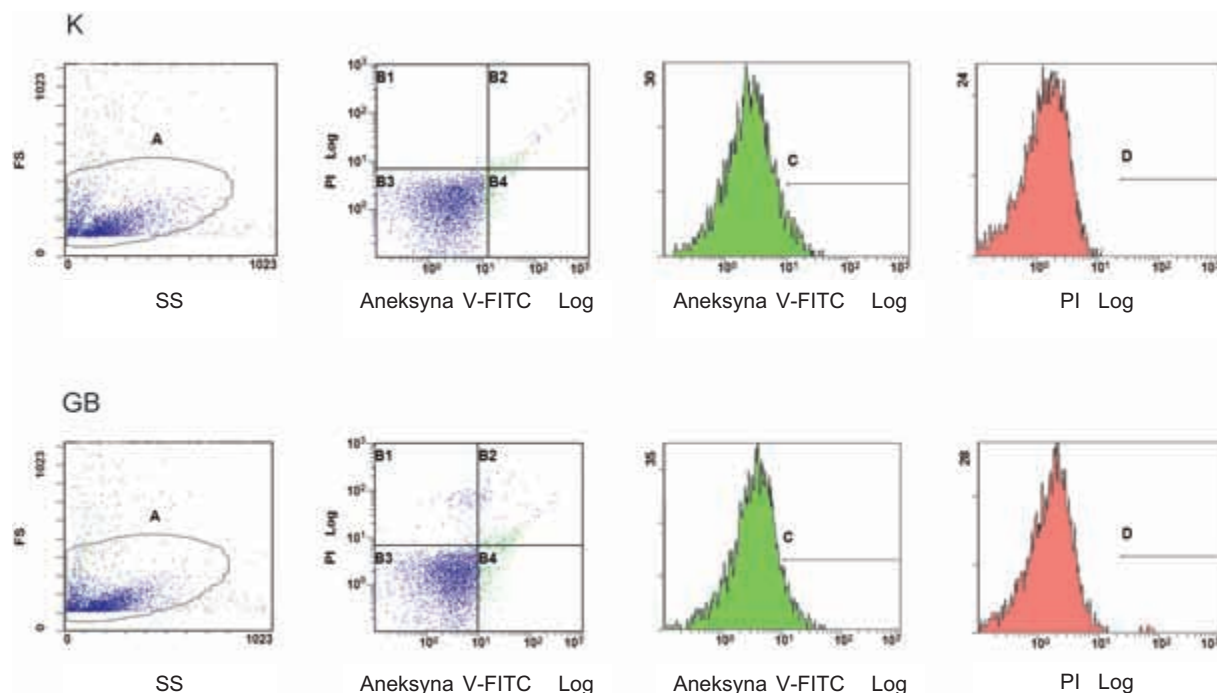
3.5.1.2. Ilościowa ocena komórek apoptotycznych i nekrotycznych

Ilościowej oceny komórek apoptotycznych w gruczołach jelita środkowego pajaków dokonano z użyciem testu BD Biosciences (Annexin V-FITC apoptosis Detection Kit; fluoresceina isotiocyaniny). W późnych fazach apoptozy, zaraz po rozpoczęciu kondensacji chromatyny, ujemnie naładowane grupy fosfatydyloseryny (PS) ulegają translokacji z powierzchni wewnętrznej na powierzchnię zewnętrzną błony komórkowej (RAYNAL, POLLARD, 1994; VERMES i in., 1995). Pozwala to w obecności jonów Ca²⁺ na przyłączenie się do grup PS antykoagulantu aneksyny V. Komórki łączące się z aneksyną V, znakowaną FITC, emitują zieloną fluorescencję. Jednoczesne zastosowanie PI, który emituje czerwoną fluorescencję, pozwoliło odróżnić komórki nekrotyczne i późnoapoptotyczne (Aneksyna V-FITC⁻/PI⁺; Aneksyna V-FITC⁺/PI⁺) od wczesnoapoptotycz-

nych, z zachowaną integralnością błony komórkowej (Aneksyna V-FITC⁺/PI⁻). Na ryc. 3.2 zamieszczono przykładowe cytogramy i histogramy identyfikujące komórki apoptotyczne i nekrotyczne w gruczołach jelita środkowego pająków z jednej z grup doświadczalnych (G — grupa głodzona).

W celu ilościowej oceny komórek apoptotycznych do 100 µl uprzednio przygotowanej zawiesiny komórek dodawano 5 µl PI oraz 5 µl

no kontrolę negatywną (K), którą stanowiła zawiesina komórek w buforze reakcyjnym, do której nie dodawano barwnika. Przygotowanie próby kontrolnej miało na celu ustalenie zakresu regionu negatywnego. Tak przygotowane zawiesiny komórek analizowano za pomocą cytometru przepływowego Coulter Instrument EPICS XL MLC z laserem argonowym, o długości fali 488 nm. Emisję światła wzbudzano w 5 000 komórek z każdej próby doświadczalnej. Wyniki



Ryc. 3.2. Przykładowa cytometryczna analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych z zastosowaniem aneksyny V znakowanej FITC (Aneksyna V-FITC) i jodku propidyny (PI) w gruczołach jelita środkowego samic *X. nemoralis* z Olkusa, z grupy głodzonej (G)

A — bramka wyznaczająca granice obszaru, w którym znajduje się analizowana grupa komórek; **B1** — komórki nekrotyczne: Aneksyna V-FITC⁻/PI⁺; **B2** — komórki późnoapoptotyczne i nekrotyczne: Aneksyna V-FITC⁺/PI⁺; **B3** — komórki żywe: Aneksyna V-FITC⁻/PI⁻; **B4** — komórki wczesnoapoptotyczne: Aneksyna V-FITC⁺/PI⁻; **C, D** — wyznaczają zakres regionu pozytywnego, w którym komórki są identyfikowane pod względem badanej cechy; **GB** — próba badana; **K** — próba kontrolna; **FS** — intensywność rozproszonego światła mierzonego na wprost w przedłużeniu promienia lasera; **SS** — intensywność rozproszonego światła mierzonego pod kątem prostym

aneksyny V-FITC. Całość inkubowano przez 15 min w ciemności i w temperaturze pokojowej, po czym do każdej próby dodawano 400 µl buforu reakcyjnego o składzie: 0,1M HEPES/NaOH (pH 7,4); 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂. Niezależnie dla każdej próby badanej (GB) przygotowa-

uzyskano na podstawie analizy poziomej fluorescencji, korzystając z programu do analizy danych cytometrycznych CXP Analysis. W tabeli 3.4 zamieszczono wartości bezwzględne i procentowe poszczególnych grup komórek z wymienionej grupy doświadczalnej.

Tabela 3.4

Wartości bezwzględne i wartości procentowe komórek w poszczególnych regionach dla grupy kontrolnej (K) oraz grupy badanej (GB) z gruczołów jelita środkowego samic *X. nemoralis* z Olkusza z grupy głodzonej (G)

Region	Grupa	Liczba komórek	Komórki [%]
B1 AneksynaV-FITC-/PI ⁺	K	7	0,14
	GB	35	0,70
	ΔGB — K	28	0,56
B2 AneksynaV-FITC ⁺ /PI ⁺	K	264	5,28
	GB	320	6,40
	ΔGB — K*	56	1,12
B3 AneksynaV-FITC-/PI ⁻	K	4 314	86,30
	GB	4 203	84,10
B4 AneksynaV-FITC ⁺ /PI ⁻	K	359	7,18
	GB	498	10,00
	ΔGB — K	139	2,82
100% = 5 000 komórek			

* Różnica ΔGB — K określa rzeczywistą liczbę komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych w poszczególnych regionach z ryc. 3.2.

3.5.1.3. Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami

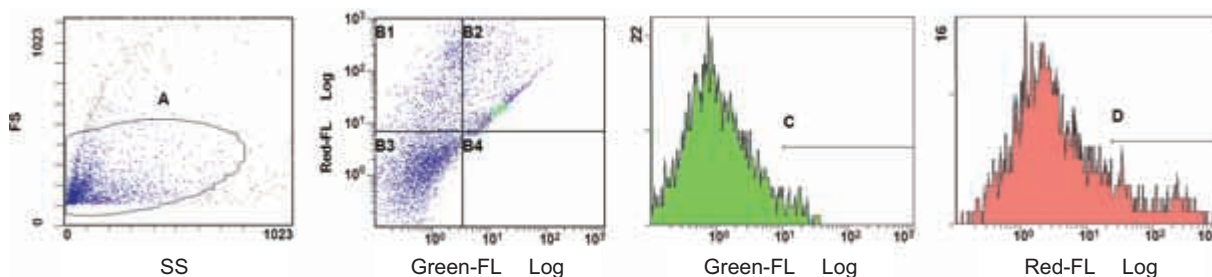
Zmiany transmembranowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) śledzono dzięki zastosowaniu kationowego barwnika JC-1 (jodek 5,5',6,6'-

tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylo-benzimidazolo-zolokarbocyanianowy), który wykazuje zależną od wielkości potencjału mitochondrialnego akumulację w mitochondriach. JC-1 różnicuje komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym (pomarańczowa fluorescencja; mitochondria spolaryzowane) i niskim potencjałem mitochondrialnym (zielona fluorescencja; mitochondria zdepolaryzowane) (REERS i in., 1991; SALVIOLI i in., 1997) — ryc. 3.3. W zastosowanej procedurze barwienia przygotowaną z użyciem dyspazy zawiesinę komórek o średniej gęstości $6 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ inkubowano w ciemności z $10 \mu\text{l}$ 1,5 mM JC1 w roztworze DMSO (99,97%, $\text{H}_2\text{O} < 0,1\%$) przez 15 min w temperaturze pokojowej. Dane analizowano, używając programu WinList, a rezultaty prezentowano jako odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (tab. 3.5).

Tabela 3.5

Wartości bezwzględne i procentowe komórek wykazujących spolaryzowane (B1, B3) i zdepolaryzowane mitochondria (B2) w gruczołach jelita środkowego samic *X. nemoralis* z Olkusza z grupy głodzonej (ryc. 3.3)

Region	Liczba komórek	Komórki [%]
B1	4 295	85,90
B2	573	11,50
B3	132	2,64
B4	0	0,00
100% = 5 000 komórek		



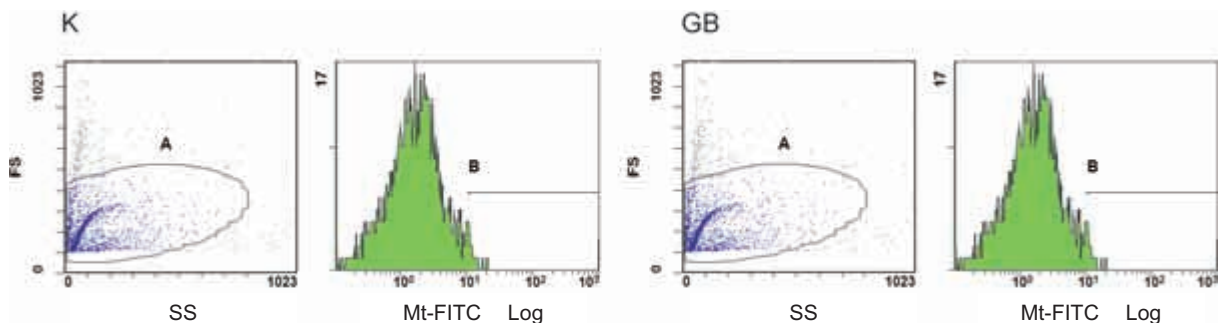
Ryc. 3.3. Przykładowa analiza potencjału mitochondrialnego $\Delta\Psi_m$ z zastosowaniem JC-1 w gruczołach jelita środkowego samic *X. nemoralis* z Olkusza, z grupy głodzonej (G)

A — bramka wyznaczająca granice obszaru, w którym znajduje się analizowana grupa komórek. Regiony B1 i B3 obejmują komórki zawierające spolaryzowane mitochondria, mieszczące się w obszarze fluorescencji pomarańczowej. Region B2 obejmuje populację komórek wykazujących zieloną fluorescencję wskazującą na zdepolaryzowanie ich mitochondriów. Obniżenie stosunku intensywności pomarańczowej (D) do zielonej fluorescencji (C) wskazuje na zwiększenie liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami

3.5.1.4. Ilościowa ocena komórek Mt pozytywnych

W ilościowej ocenie komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałami dla metalotionein (Mt) stosowano specyficzne przeciwciała I-rzędowe (DakoCytomation; Monoclonal Mouse, Anti-Metallothionein; Dako-MT, E9) oraz przeciwciała II-rzędowe sprzężone z FITC (DakoCytomation; Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC Fab (ab')₂). Ponieważ badane białka zlokalizowane są wewnątrzkomórkowo, zastosowano również preparat utrwalająco-permabilizujący (Coulter; IntraPrepTM), który umożliwia dostępność wewnątrzkomórkowych antygenów cytoplazmatycznych i jądrowych. Za-

buforowanego utrwalacza zawierającego 5,5% formaldehyd i inkubowano przez 15 min w temperaturze 25°C. Następnie zawiesinę komórek płukano przez odwirowanie w 250 g przez 5 min. Otrzymane supernatanty zlewano, a do precipitatu dodawano 100 µl buforu permabilizującego, inkubowano przez 5 min, a następnie dodawano 10 µl nierozcieńzonego specyficznego przeciwciała I-rzędowego dla Mt. Całość inkubowano przez 30 min w temperaturze 25°C. Po tym czasie komórki powtórnie płukano przez odwirowanie w 250 g przez 5 min. Następnie do precipitatu dodawano 10 µl nierozcieńzonego przeciwciała II-rzędowego i inkubowano w 25°C przez 30 min, po czym powtarzano procedurę płukania komórek. Komórki zawieszano następnie w 1 ml buforu PBS i analizowano cytometrycznie (ryc. 3.4).



Ryc. 3.4. Przykładowa cytometryczna analiza komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samicy *X. nemoralis* z Olkusza, z grupy głodzonej

A — bramka wyznaczająca granice obszaru, w którym znajduje się analizowana grupa komórek. Regiony B w poszczególnych histogramach (K — kontrola; GB — próba badana) wyznaczają zakres obszaru pozytywnego dla fluorescencji zielonej klasyfikującej komórki Mt pozytywne

daniem preparatu utrwalającego jest stabilizacja błony komórkowej, a tym samym niedopuszczenie do jej niekontrolowanego rozpadu w momencie użycia drugiego z reagentów — czynnika permabilizującego (medium oparte na saponinach, buforowane PBS i zawierające 0,1% NaN₃). Czynniki te uczestniczą w tworzeniu otworów w błonie komórkowej bez naruszenia jej morfologii, zachowując właściwości komórek niezbędne do charakterystyki cytometrycznej.

Procedura przygotowania komórek do analiz cytometrycznych przedstawiała się następująco: 50 µl zawiesiny komórek zawieszano w 100 µl

Dla każdej próby badanej (GB) przygotowywano kontrolę (K), do której dodawano jedynie nierozcieńczone przeciwciała II-rzędowe tej samej klasy co przeciwciała I-rzędowe. Kontrola służyła do eliminacji świecenia niespecyficznego (YURKOV, MAKHIJANI, 1998). Na ryc. 3.4 zaprezentowano przykładowe wykresy oraz odpowiadające im wartości liczbowe charakteryzujące osobniki jednej z grup doświadczalnych (tab. 3.6).

Tabela 3.6

Wartości bezwzględne i wartości procentowe komórek Mt pozytywnych w grupie kontrolnej (K) oraz w grupie badanej (GB) w gruczołach jelita środkowego samicy *X. nemoralis* z Olkusza z grupy głodzonej

Region B	Liczba komórek	Komórki [%]
K	430	8,60
GB	683	13,70
$\Delta GB - K^*$	253	5,10
100% = 5 000 komórek		

* $\Delta GB - K$ określa rzeczywistą liczbę komórek Mt pozytywnych z ryc. 3.4.

Tabela 3.7

Wartości bezwzględne i wartości procentowe komórek Hsp70 pozytywnych w grupie kontrolnej (K) oraz w grupie badanej (GB) w gruczołach jelita środkowego samicy *X. nemoralis* z Olkusza z grupy głodzonej

Region B	Liczba komórek	Komórki [%]
K	245	4,90
GB	334	6,68
$\Delta GB - K^*$	89	1,78
100% = 5 000 komórek		

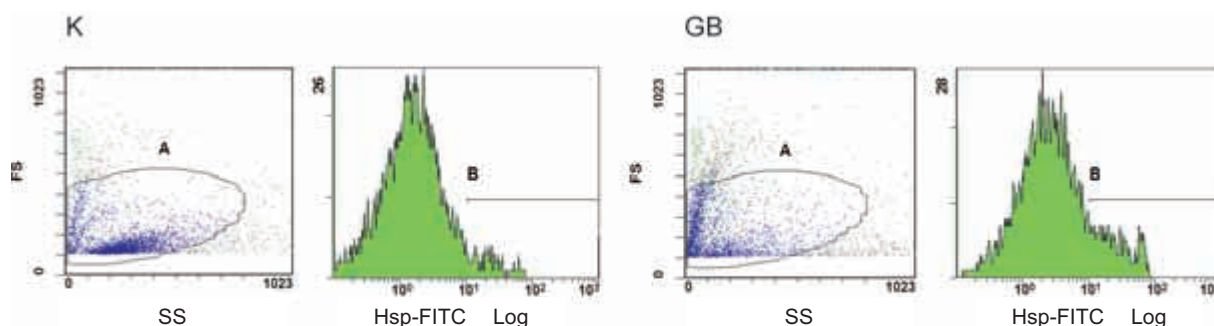
* $\Delta GB - K$ określa rzeczywistą wartość komórek Hsp70 pozytywnych z ryc. 3.5.

3.5.1.5. Ilościowa ocena komórek Hsp70 pozytywnych

Procedura cytometrycznego oznaczania komórek Hsp70 pozytywnych przebiegała podobnie, jak w przypadku oznaczania komórek Mt pozytywnych, z wyjątkiem zastosowania innych przeciwciał I- i II-rzędowych, którymi były odpowiednio: Anti-Hsp70 clone C92F3A-5 (Calbiochem) i Anti-mouse IgG heavy and light chain fluorescein conjugate (Calbiochem) (ryc. 3.5, tab. 3.7).

3.5.1.6. Proteazy kaspazopodobne (Cas-3)

Aktywność proteaz kaspazopodobnych oznaczano metodą kolorymetryczną, korzystając z zestawu do oznaczeń kaspazy-3: BD ApoAlert™ Caspase Colorimetric Assay Kit. Metoda ta opiera się na spektrofotometrycznej detekcji *p*-nitroaniliny (*p*NA) po jej odcięciu przez enzym od substratu DEVD-*p*NA (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-nitroanilid). W związku z tym, że wymieniony zestaw dotychczas był stosowany głównie w przypadku badań na kręgowcach



Ryc. 3.5. Przykładowa cytometryczna analiza komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samicy *X. nemoralis* z Olkusza, z grupy głodzonej

A — bramka wyznaczająca granice obszaru, w którym znajduje się analizowana grupa komórek. Regiony B w poszczególnych histogramach (K — kontrola; GB — próba badana) wyznaczają zakres obszaru pozytywnego dla fluorescencji zielonej, klasyfikującej komórki Hsp70 pozytywne

i nie dysponujemy porównawczymi rezultatami z jego zastosowania u pajaków, w pracy oznaczany enzym przyjęto nazywać proteazą kaspazopodobną (Cas-3).

Zawiesinę komórek ($2 \cdot 10^6$) w 0,05 M buforze fosforanowym Sörensen (Na₂HPO₄-KH₂PO₄) o pH 7,4 wirowano w 400 g przez 5 min. Do precypitatu dodawano 400 µl zimnego buforu lizującego i próby inkubowano na lodzie przez 10 min. Po tym czasie lizaty powtórnie wirowano przez 10 min w temperaturze 0°C w 30 000 g. Po oczyszczeniu supernatanty przenoszono do nowych probówek i umieszczano na lodzie. Bezpośrednio przed oznaczeniami przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą: bufor reakcyjny (2X Reaction Buffer) i 10 mM DTT. Zgodnie z zaleceniami producenta dla każdej próby badanej, zawierającej substrat DEVD-*p*NA, przygotowano próbę kontrolną, która nie zawierała substratu. Dodatkowo z powodu braku kontroli pozytywnej sporządzono także próbę z inhibitorem DEVD-fmk (*aspartic glutamic valyl aspartate fluoromethylketone*) według schematu, jaki podano w tab. 3.8.

3.5.2. Wskaźniki antyoksydacyjne

Materiał przeznaczony do analizy wskaźników antyoksydacyjnych homogenizowano w homogenizatorze szklano-teflonowym, w pomieszczeniu chłodni w temperaturze 4°C, stosując 0,05 M bufor Sörensen (Na₂HPO₄-KH₂PO₄) o pH 7,4 (1:50 w/v). Przygotowane homogenaty wirowano przez 10 min w 20 000 g w celu uzyskania frakcji postmitochondrialnej. Po odwirowaniu, dekantacji i rozcieńczeniu supernatanty rozdzielano do probówek Eppendorfa w ilościach niezbędnych do przeprowadzenia oznaczeń aktywności poszczególnych enzymów oraz zawartości białka i zamrażano w temperaturze -70°C.

Porcję supernatantu przeznaczoną do oznaczenia stężenia glutationu całkowitego natychmiast po odwirowaniu mieszano z 10% kwasem nadchlorowym w stosunku objętościowym 1:1, w celu odbiałczania. Następnie próbkę wirowano w temperaturze 4°C przez 10 min w 3 000 g w celu oddzielenia wytrąconego białka i do czasu przeprowadzenia oznaczeń roztwór znajdował

Tabela 3.8

Skład mieszaniny reakcyjnej próby badanej, kontrolnej i zawierającej inhibitor

Próba badana	Próba kontrolna (bez substratu)	Próba z inhibitorem
50 µl supernatantu	50 µl supernatantu	50 µl supernatantu
Inkubacja 30 min na lodzie	inkubacja 30 min na lodzie	1 µl DEVD-fmk inkubacja 30 min na lodzie
50 µl 2X bufor reakcyjny/DTT	50 µl 2X bufor reakcyjny + DTT	50 µl 2X bufor reakcyjny + DTT
1 µl DMSO	1 µl DMSO	—
5 µl 1 mM DEVD- <i>p</i> NA	5 µl DMSO	5 µl 1 mM DEVD- <i>p</i> NA
Inkubacja w 37°C przez 2 godz.		

Odczyty absorbancji prób przeprowadzono przy długości fali 405 nm, w 100 µl kuwetach kwarcowych. Ilość powstającego produktu odczytywano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono, wykorzystując *p*-nitroanilinę (*p*NA) o znanym stężeniu. Aktywność enzymu wyrażano w nmol *p*NA · mg⁻¹ białka.

du przechowywano w zamrażarce w temperaturze -70°C. Analizę stężenia glutationu oraz aktywności enzymów wykonano metodami spektrofotometrycznymi zgodnie z powszechnie przyjętymi procedurami.

3.5.2.1. Glutaton całkowity (GSH + GSSG)

Zawartość glutationu całkowitego: łącznie zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG), oznaczano według metody TIETZEGO (1969), zmodyfikowanej przez ALLENA i in. (1984). Zasada reakcji polega na katalitycznym działaniu glutationu zredukowanego w układzie, w którym ulega on cyklicznemu utlenieniu przez kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB). Obecna w mieszaninie reakcyjnej reduktaza glutationowa (GR), z udziałem NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), przeprowadza disulfid glutationu (GSSG) w formę zredukowaną (GSH), uczestniczącą w reakcji z DTNB. Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował: 300 μ l 1 mM roztworu DTNB w 0,1 M buforze fosforanowym ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) o pH 7,5, zawierający EDTA w stężeniu 5 mM; 50 μ l reduktazy glutationowej (GR) w stężeniu 10 U $\cdot$ ml⁻¹; 100 μ l roztworu 1 mM NADPH. Reakcję rozpoczynano, dodając do mieszaniny 50 μ l supernatantu, po czym mierzono szybkość przyrostu absorbancji w ciągu 6 min, przy długości fali świetlnej 410 nm. Do pomiaru absorbancji użyto spektrofotometru Epoll 20. Stężenie glutationu odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej na podstawie znanego stężenia glutationu w zakresie 5—20 μ g glutationu $\cdot$ ml⁻¹ roztworu oraz zmierzoną zawartość białka w próbce. Zawartość glutationu wyrażano w ng $\cdot$ mg białka⁻¹.

3.5.2.2. Peroksydazy glutationowe: selenozależna (GPOX; EC 1.11.1.9) i niezależna od selenu (GSTPx)

Oznaczenie wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez SIMMONSA i in. (1989). W metodzie tej mierzy się tempo redukcji nadtlenu wodoru lub nadtlenu kumenu. Dodanie

NADPH i reduktazy glutationowej (GR), enzymu odtwarzającego glutation w postaci zredukowanej, zapewnia obecność GSH na stałym poziomie. Dodanie azydki sodu (NaN_3) blokuje aktywność obecnej w supernatancie katalazy konkurującej z GPOX o H_2O_2 .

Selenozależna peroksydaza glutationowa (GPOX) uczestniczy zarówno w usuwaniu nadtlenu wodoru, jak i nadtlenu organicznych. Z kolei peroksydaza glutationowa niezależna od selenu (GSTPx) neutralizuje organiczne nadtlaki, takie jak wodoronadtlenek kumenu i uważana jest raczej za transferazę o funkcji peroksydazy glutationowej, ale często ze względów zwyczajowych nazywana peroksydazą glutationową selenoniezależną (AHMAD i in., 1989; AHMAD, PARDINI, 1990; PARDINI, 1995). Mieszanina reakcyjna zawierała: 250 μ l 0,1 M buforu fosforanowego ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) o pH 7, z 2 mM EDTA i 2 mM NaN_3 ; 50 μ l reduktazy glutationowej (GR) (6 IU GR(ml⁻¹); 50 μ l 10 mM GSH w buforze fosforanowym ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) o pH 7,4; 50 μ l 2,5 mM NADPH w buforze fosforanowym ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) o pH 7,4; 50 μ l supernatantu oraz 50 μ l 2,5 mM H_2O_2 lub 15 mM wodoronadtlenku kumenu w wodzie destylowanej.

Pomiary przeprowadzano w ciągu 5 min, odczytując zmiany absorbancji wynikające z przekształcenia NADPH w NADP, o długości fali świetlnej 340 nm na spektrofotometrze Epoll 20. Pomiar trwał 5 min. Miarą aktywności jest ilość utlenionego NADPH wyrażona w nmol $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ mg białka⁻¹, przeliczona za pomocą współczynnika ekstynkcji dla NADPH równego $6,22 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.5.2.3. S-transferaza glutationowa (GST; EC 2.5.1.18)

Aktywność GST oznaczono metodą YU (1982), wykorzystującą jako substrat 1-chloro-2,4-dwunitrobenzen (CDNB). Zasada reakcji polega na sprzęganiu substratu z glutationem, w wyniku czego powstaje S-2,4-dwunitrofenylo-glutaton, który zmienia absorbancję roztworu.

Wyjściowa mieszanina reakcyjna obejmowała: 1 ml 1 mM roztworu zredukowanego glutationu w buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz 25 μ l supernatantu. Reakcję inicjowano przez dodanie 10 μ l 15 mM roztworu CDNB w 96% etanolu. Zmiany absorbancji mierzono przez 5 min przy długości fali 340 nm na spektrofotometrze Epoll 20. Uzyskane wyniki po skorygowaniu względem próby ślepej (supernatant zastąpiony buforem Sørensen o pH 7,4) przeliczano na aktywność enzymu, przyjmując współczynnik ekstynkcji powstającego produktu równy $9,6 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. Aktywność specyficzną enzymu wyrażono w $\text{nmol CDNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka.

3.5.2.4. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD; EC 1.15.1.1)

Aktywność tego enzymu oznaczano w frakcji postmitochondrialnej metodą adrenochromową MISRY i FRIDOVICHA (1972), w której korzysta się ze zjawiska spontanicznej autooksydacji adrenaliny do adrenochromu w obecności tlenu atmosferycznego. Autooksydacja adrenaliny jest źródłem rodników ponadtlenkowych, unieczynianych przez dysmutazę ponadtlenkową.

Mieszanina reakcyjna składała się z 0,05 M buforu dwuwęglanowego ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$) o pH 10,2 oraz z 0,1 M HCl o pH 2, w którym znajdowała się rozpuszczona adrenalina (7 mg na 4 ml 0,1 M HCl). Procedura oznaczania składała się z dwóch etapów. W pierwszej kolejności ustalano autooksydację adrenaliny. W tym celu w kuwecie spektrofotometrycznej odmierzano 2,9 ml buforu dwuwęglanowego i 100 μ l adrenaliny. Po dokładnym wymieszaniu mierzono zmianę absorbancji przy długości fali 480 nm na spektrofotometrze UV/VIS CECIL 3000. Maksymalna szybkość przyrostu absorbancji po 2–3 min wynosiła $0,025 \cdot \text{min}^{-1}$. W drugim etapie, korzystając z tych samych ustawień, poszukiwano takiej objętości próby, w której następuje połowiczne zahamowanie tempa autooksydacji. Pomiaru zmian absorbancji próby badanej dokonywano w podobnym interwale czasowym.

Objętości homogenatu dodawane do próby badanej były różne dla poszczególnych prób i wynosiły od 10 μ l do 100 μ l. Aktywność enzymu wyrażono w umownych jednostkach aktywności specyficzej (J.A.) Misry i Fridovicha $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka, definiowaną jako ilość enzymu, która w porównaniu z kontrolą powoduje 50% hamowanie autooksydacji adrenaliny w ciągu 1 min.

3.5.2.5. Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6)

Aktywność katalazy oznaczano we frakcji postmitochondrialnej metodą opracowaną przez ORRA (1970), w której wyzyskuje się zjawisko katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru absorbuje promieniowanie nadfioletowe, można więc łatwo śledzić spadek pochłaniania promieniowania przez roztwór zawierający ten związek, wywołany wprowadzeniem katalazy do kuwety spektrofotometrycznej (BARTOSZ, 1995). Do oznaczenia aktywności CAT użyto 0,05 M buforu fosforanowego ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$), pH 7,4, 100 mM roztworu H_2O_2 w buforze fosforanowym oraz rozcieńczonego 40-krotnie supernatantu w buforze fosforanowym Sørensen. Próbę ślepą sporządzano jak próbę badaną, dodając do mieszaniny 500 μ l wody zamiast nadtlenu wodoru. Pomiaru dokonywano na spektrofotometrze UV/VIS CECIL 3000 przy długości fali 230 nm metodą różnicową, z wykorzystaniem dwóch gniazd: pomiarowego i referencyjnego. Pomiar trwał 30 s w miarę obniżania się ekstynkcji. Aktywność enzymu obliczano, używając wartości molowego współczynnika ekstynkcji $40 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ i wyrażano $\text{mM H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka.

3.6. Oznaczanie stężenia białka

Dla każdej wykonanej próby białko oznaczono metodą Bradford (1976). Metoda ta opiera się

na zjawisku wiązania się w środowisku kwaśnym cząsteczek barwnika Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB) z białkiem, co powoduje zmianę zabarwienia roztworu z czerwono-brązowej na niebieską. Stężony, kwaśny roztwór wodny odczynnika białkowego o składzie: CBB — 0,01%, etanol — 4,7%, kwas ortofosforowy — 8,5% pięciokrotnie rozcieńczano wodą destylowaną. Do 50 µl każdej próby dodano 2,5 ml odpowiednio przygotowanego odczynnika białkowego. Absorbancję próby odczytywano przy długości fali 595 nm. Stężenie białka w próbce określono na podstawie krzywej wzorcowej wykorzystującej albuminę bydlęcą jako standard.

3.7. Analizy statystyczne

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie za pomocą programu STATISTICA® w wersji 5.1. Obliczono wartości średnie i odchylenie standardowe. Do oceny istotności różnic między grupami doświadczalnymi w poziomie analizowanych parametrów w zależności od czynnika stresogennego, płci i stanowiska wykorzystano metodę analizy wariancji dla klasyfikacji pojedynczej i wieloczynnikowej (ANOVA/MANOVA) w wyniku zastosowania testu Tukeya dla nierównych grup, przy poziomie istotności $p < 0,05$. Jednorodność wariancji sprawdzano testem Levene'a. Dla takiego samego poziomu istotności wyznaczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona dla aktywności enzymów, białek stresu i wskaźników śmierci komórkowej w obrębie wyróżnionych grup pająków.

3.8. Odczynniki chemiczne

Wszystkie wodne roztwory odczynników sporządzono na ultraczystej wodzie uzyskanej

w procesie odwróconej osmozy w systemie oczyszczania wody Millipore® Elix S™ i Millipore® Simplicity™.

- BAYER: Bi_R58 (dimetoat; ditiofosforan *O,O*-dimetylo-*S*-metylokarbamoilometylu).
- BD Biosciences: ANNEXIN V-FITC apoptosis Detection Kit.
- BD Biosciences Clontech: BD ApoAlert™ Caspase Colorimetric Assay Kit.
- CALBIOCHEM: Anti-Hsp70, human/mouse), Anti-mouse IgG heavy and light chain fluorescein conjugate, JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolozolokarbocyanianowy).
- COULTER: formaldehyd, IntraPrep™ Permeabilization Reagent, sodu azydek.
- DakoCytomation: Monoclonal Mouse Anti-Metallothionein (E9), Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC Fab (ab')₂.
- FLUKA: *L*-adrenalina, albumina bydlęca (BSA), Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB), 1,4-ditio-DL-treitol (DTT), glutation zredukowany (GSH), reduktaza glutationowa (GR).
- Lubelskie Odczynniki Chemiczne: kwas wersenowy (EDTA).
- POCh: aceton, etanol 99,8%, kwas nadchlorowy 70%, kwas orto-fosforowy 85%, kwas solny 30%, diwodorofosforan potasu bezwodny, chlorek sodu, diwodorofosforan sodu bezwodny, diwodorofosforan sodu 2. hydrat., węglan sodu, wodorotlenek sodu, wodorowęglan sodu, chlorek wapnia, nadtlenuk wodoru 30%.
- SIGMA: *L*-adrenalina, bufor fosforanowy (PBS), 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), dyspaza, dioctan fluoresceiny (FDA), fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), glutation zredukowany (GSH), jodek propidyny (PI), kumenu wodorotlenek, kwas 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoesowy) (DTNB), *p*-nitroanilina (*p*-NA), reduktaza glutationowa (GR), sulfotlenek dimetylowy (DMSO).

4. Wyniki

4.1. Analiza czynnikowa udziału zastosowanych stresorów oraz płci i stanowiska w odpowiedziach komórkowych u pająków

Wśród wyodrębnionych zmiennych grupujących: czynniki stresogenne, płeć oraz stanowisko, największy wpływ na wystąpienie różnic między podobnie traktowanymi grupami pająków obu gatunków miało działanie czynników stresogennych (tab. 4.1—4.8). Wzorce zmian analizowanych parametrów w odpowiedzi na poszczególne

stresory były u obu gatunków podobne, lecz ich zakres był większy w przypadku *X. nemoralis*.

Pajaki *A. labyrinthica* przejawiały podobne reakcje komórkowe jak *X. nemoralis* głównie w odpowiedzi na działanie pestycydu (P) oraz łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu (T+P) (tab. 4.1—4.6). Efekt działania wymienionych stresorów w porównaniu z wartościami kontrolnymi przejawiał się zwiększeniem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.1) oraz komórek apoptotycznych (ryc. 4.3) i nekrotycznych (ryc. 4.4) w analizowanym narządzie. W wymienionych grupach zarejestrowano ponadto większy niż u zwierząt kontrolnych odsetek komórek Hsp70 pozytyw-

Tabela 4.1

Wyniki analizy wariancji wartości parametrów opisujących cechy śmierci komórkowej w gruczołach jelita środkowego samic i samców *A. labyrinthica* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	$\Delta\Psi_m$			Cas-3			Aneksyna ⁺ , PI ⁻			Aneksyna ⁻ , PI ⁺		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	139,7	95,4	<0,001	3,1	173,0	<0,001	0,69	2,2	0,14	0,25	60,9	<0,001
Stresory*	464,1	316,8	<0,001	2,6	148,6	<0,001	49,2	161,2	<0,001	1,4	352,7	<0,001
T	1 195,0	72,4	<0,001	6,8	10,8	0,002	0,02	2,7	0,1	0,07	23,7	<0,001
P	366,5	166,1	<0,001	0,6	39,6	<0,001	0,4	33,5	<0,001	0,05	16,9	<0,001
T+P	776,0	176,0	<0,001	6,3	46,8	<0,001	0,97	10,1	0,002	0,93	11,6	0,001
G	6,2	3,5	0,05	0,9	28,5	<0,001	128,8	133,7	<0,001	4,1	173,8	<0,001
Płeć	29,9	20,4	<0,001	0,1	3,1	0,08	0,3	0,98	0,3	0,08	15,9	<0,001
Stanowisko/płeć	49,3	33,6	<0,001	2,9	164,0	<0,001	0,12	0,39	0,5	0,51	125,5	<0,001
Stresory*/płeć	12,5	8,5	<0,001	3,3	186,0	<0,001	3,5	11,7	<0,001	0,5	123,7	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	20,9	14,3	<0,001	1,8	104,5	<0,001	0,4	1,3	0,3	0,2	46,3	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

Tabela 4.2

Wyniki analizy wariancji wartości parametrów opisujących cechy śmierci komórkowej w gruczołach jelita środkowego samic i samców *X. nemoralis* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych

Zmienna grupująca	$\Delta\Psi_m$			Cas-3			Aneksyna ⁺ , PI ⁻			Aneksyna ⁻ , PI ⁺		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	94,5	6,4	0,01	5,9	12,9	<0,001	0,82	1,8	0,2	0,03	0,33	0,6
Stresory*	881,9	60,0	<0,001	19,8	43,5	<0,001	137,4	296,9	<0,001	2,8	33,8	<0,001
T	961,9	182,1	<0,001	3,03	104,4	<0,001	0,43	107,7	<0,001	0,66	16,5	<0,001
P	2 284,0	320,1	<0,001	1,01	28,4	<0,001	0,55	21,5	<0,001	3,2	72,5	<0,001
T+P	2 452,0	48,9	<0,001	1,3	85,4	<0,001	4,6	94,9	<0,001	3,6	50,7	<0,001
G	323,5	68,9	<0,001	62,1	19,7	<0,001	374,6	142,9	<0,001	9,7	14,4	<0,001
Płeć	599,5	40,8	<0,001	10,8	23,7	<0,001	8,05	17,4	<0,001	6,5	76,9	<0,001
Stanowisko/płeć	32,5	2,2	0,14	2,06	4,5	0,05	0,17	0,37	0,5	0,04	0,46	0,6
Stresory*/płeć	179,6	12,2	<0,001	11,7	25,6	<0,001	16,2	34,9	<0,001	2,02	24,1	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	53,8	3,7	<0,001	4,4	9,6	<0,001	1,4	2,9	0,02	1,9	23,3	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

nych (ryc. 4.5) i Mt pozytywnych (ryc. 4.6), jak również większe zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych związanych z metabolizmem glutationu (ryc. 4.14—4.16).

Wykazano wysoko istotną zależność między wielkością wskaźników śmierci komórkowej w gruczołach jelita środkowego pajaka niebudującego sieci (*X. nemoralis*) a wszystkimi zastosowanymi czynnikami stresogennymi (tab. 4.2). Niezależnie od charakteru wywierały one

stymulujący efekt na ilościowe zmiany apoptotyczne i nekrotyczne (ryc. 4.9—4.10). Wzrost liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, jak również wzrost liczby komórek nekrotycznych w odniesieniu do wartości kontrolnych był wyższy w gruczołach jelita środkowego *X. nemoralis* niż *A. labyrinthica*.

Stymulujący efekt szoku termicznego oraz pestycydu, działających osobno i łącznie, w przypadku *X. nemoralis* wykazano w odnie-

Tabela 4.3

Wyniki analizy wariancji ilościowych zmian komórek Mt i Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samic i samców *A. labyrinthica* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	Mt			Hsp70		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	18,9	27,4	<0,001	0,2	0,1	0,8
Stresory*	49,9	71,9	<0,001	64,1	186,3	<0,001
T	25,2	18,6	<0,001	26,9	183,6	<0,001
P	160,6	18,4	<0,001	11,3	51,04	<0,001
T+P	52,2	39,9	<0,001	52,2	39,2	<0,001
G	112,2	108,5	<0,001	224	77,03	<0,001
Płeć	13,3	19,2	<0,001	0,1	0,23	0,6
Stanowisko/płeć	8,5	12,2	<0,001	43,7	127	<0,001
Stresory*/płeć	31,8	46,01	<0,001	13,5	39,3	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	22,8	32,9	<0,001	18,8	54,6	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

Tabela 4.4

Wyniki analizy wariancji ilościowych zmian komórek Mt i Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samic i samców *X. nemoralis* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	Mt			Hsp70		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	45,1	47,5	<0,001	12,1	12,2	<0,001
Stresory*	50,9	53,2	<0,001	147,8	149,4	<0,001
T	5,2	33,3	<0,001	355,8	330,8	<0,001
P	175,7	147,4	<0,001	57,5	127,4	<0,001
T+P	43,7	19,9	<0,001	237,6	23,1	<0,001
G	36,6	21,4	<0,001	1,1	0,65	0,4
Płeć	41,1	42,9	<0,001	206,6	208,9	<0,001
Stanowisko/stresory*	25,25	26,4	<0,001	80,2	81,1	<0,001
Stanowisko/płeć	2,2	2,3	0,13	22,1	22,3	<0,001
Stresory*/płeć	8,9	9,3	<0,001	82,2	83,1	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	7,01	7,3	<0,001	13,3	13,5	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

sieniu do ilościowych zmian komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałami dla białek Mt i Hsp70 (tab. 4.4) oraz parametrów antyoksydacyjnych (tab. 4.6). Nie zmieniła się istotnie aktywność GPOX w gruczołach jelita środkowego *X. nemoralis* w warunkach działania szoku termicznego (T) (tab. 4.6). Głodzenie pajaków tego gatunku (grupa G) nie spowodowało istot-

nych zmian w ilości komórek Hsp70 pozytywnych (tab. 4.4) oraz aktywności SOD (tab. 4.8).

Głodzenie okazało się czynnikiem, który u przedstawicieli *A. labyrinthica* słabo oddziaływał na aktywność enzymów związanych z metabolizmem glutationu (tab. 4.5). Także szok termiczny w niewielkim stopniu różnicował poziom takich parametrów jak: liczba komórek

Tabela 4.5

Wyniki analizy wariancji zmian stężenia glutationu i aktywności enzymów związanych z metabolizmem tego trójępeptydu w gruczołach jelita środkowego samic i samców *A. labyrinthica* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	GSH + GSSG			GPOX			GSTPx			GST		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	122 368	7,4	0,01	12 256	125	<0,001	2 509	27,2	<0,001	30 213	25,2	<0,001
Stresory*	322 421	19,4	<0,001	4 382	44,9	<0,001	2 114	22,9	<0,001	45 110	37,6	<0,001
T	1 050 614	64,7	<0,001	0,2	0,002	0,9	488	6,9	0,01	7 447	4,5	0,03
P	537 755	29,9	<0,001	4 033	8,3	0,006	1,3	0,02	0,8	12 256	9,4	0,003
T+P	858 851	96,3	<0,001	10 460	6,8	0,01	6 394	9,6	0,003	125 256	10,3	0,002
G	424 568	11,6	0,001	14,3	0,07	0,8	444,3	2,8	0,1	619	0,7	0,4
Płeć	313 882	18,9	<0,001	19 752	202,6	<0,001	10 044	108,8	<0,001	144 497	120,5	<0,001
Stanowisko/płeć	164 548	9,9	0,002	13 594	139,4	<0,001	1 344	14,6	<0,001	7 646	6,4	0,01
Stresory/płeć	132 695	7,9	<0,001	4 754	48,7	<0,001	1 984	21,5	<0,001	52 035	43,4	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	41 299	2,5	0,05	1 858	19,1	<0,001	1 286	13,9	<0,001	11 772	9,8	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

Tabela 4.6

Wyniki analizy wariancji zmian stężenia glutationu i aktywności enzymów związanych z metabolizmem tego trójpeptydu w gruczołach jelita środkowego samic i samców *X. nemoralis* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	GSH + GSSG			GPOX			GSTPx			GST		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	338 949	10,1	0,002	496	1,9	0,2	0,001	0,000	0,99	25 375	19,4	<0,001
Stresory*	1 169 289	34,8	<0,001	9 681	37,9	<0,001	4 052	39,4	<0,001	126 424	96,6	<0,001
T	1 186 707	106,0	<0,001	122,8	0,8	0,4	1 188	11,8	0,001	216 424	305,2	<0,001
P	1 295 700	49,7	<0,001	28 470	83,2	<0,001	1 610	16,6	<0,00	114 182	73,8	<0,001
T+P	2 068 325	32,8	<0,001	9 938	9,9	0,003	3 723	6,02	10,02	70 321	32,8	<0,001
G	4 356 990	12,2	0,001	6 371	16,8	<0,001	14 735	139,1	<0,001	20 954	8,5	0,006
Płeć	2 157	6,4	0,013	23 032	90,3	<0,001	12 357	120,2	<0,001	47 046	35,9	<0,001
Stanowisko/płeć	12 668	0,4	0,54	1 670	6,5	0,01	6 479	63	<0,001	57 430	43,9	<0,001
Stresory/płeć	3 030 566	90,2	<0,001	14 795	58	<0,001	4 666	45,4	<0,001	96 986	74,1	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	867 149	25,8	<0,001	681	2,7	0,04	1 110	10,8	<0,001	80 520	61,5	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

apoptotycznych (tab. 4.1) oraz aktywność GPOX i GST (tab. 4.5), natomiast łączne działanie szoku termicznego i dimetoatu (T+P) nie miało znaczącego wpływu na aktywność SOD i CAT (tab. 4.7).

W przypadku *A. labyrinthica* płeć stanowiła czynnik istotnie różnicujący zmiany wielkości potencjału mitochondrialnego, poziom zmian nekrotycznych oraz wszystkich parametrów antyoksydacyjnych (tab. 4.1, 4.5). W przypadku

X. nemoralis wykazano odmienny u samic niż u samców poziom wszystkich wskaźników śmierci komórkowej (tab. 4.2), białek stresu (tab. 4.4) oraz enzymów związanych z metabolizmem glutationu (tab. 4.6).

Stężenie glutationu i aktywność enzymów związanych z metabolizmem tego tripeptydu w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica* zależały od stanowiska, z którego odławiano pająki (tab. 4.5), natomiast ilościowe zmiany

Tabela 4.7

Wyniki analizy wariancji zmian aktywności SOD i CAT w gruczołach jelita środkowego samic i samców *A. labyrinthica* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	SOD			CAT		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	158,6	2,0	0,2	0,00	0,02	0,9
Stresory*	466,2	5,9	<0,001	0,39	15,6	<0,001
T	876,7	4,1	0,05	0,02	0,9	0,3
P	1,9	0,01	0,9	0,09	1,6	0,2
T+P	623	2,7	0,1	0,01	0,3	0,6
G	1 040	4,3	0,04	0,72	63,8	<0,001
Płeć	8 264	104,2	<0,001	0,74	29,6	<0,001
Stanowisko/płeć	0,7	0,01	0,9	0,10	4,2	0,05
Stresory*/płeć	405	5,1	<0,001	0,11	4,6	0,002
Stanowisko/stresory*/płeć	14,1	0,2	0,9	0,06	2,3	0,07

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

Tabela 4.8

Wyniki analizy wariancji zmian aktywności SOD i CAT w gruczołach jelita środkowego samic i samców *X. nemoralis* z różnych stanowisk poddanych działaniu czynników stresogennych naturalnych i antropogennych

Zmienna grupująca	SOD			CAT		
	Ms efekt	F	p	Ms efekt	F	p
Stanowisko	251,6	0,6	0,4	0,55	77,3	<0,001
Stresory*	18 099	43,5	<0,001	0,69	96,1	<0,001
T	48 874	77,7	<0,001	1,06	107,3	<0,001
P	13 927	75,03	<0,001	0,97	218,8	<0,001
T+P	19 719	32,1	<0,001	2,7	323,04	<0,001
G	14,8	0,03	0,8	0,7	24,1	<0,001
Płeć	1 355	3,3	0,07	0,03	4,2	0,05
Stanowisko/płeć	22 501	54,2	<0,001	0,09	13,1	<0,001
Stresory*/płeć	7 163	17,3	<0,001	0,09	12,1	<0,001
Stanowisko/stresory*/płeć	2 414	5,8	<0,001	0,08	11,8	<0,001

* Efekt łącznego działania wszystkich czynników stresogennych.

komórek apoptotycznych (tab. 4.1), komórek Hsp70 pozytywnych (tab. 4.3) oraz poziom aktywności SOD i CAT (tab. 4.7) w analizowanym narządzie osobników tego gatunku były podobne niezależnie od stanowiska. W przypadku *X. nemoralis* nie potwierdzono istotnego znaczenia stanowiska jako czynnika różnicującego odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych (tab. 4.2), jak również poziom aktywności GPOX i GSTPx (tab. 4.6) oraz SOD w gruczołach jelita środkowego (tab. 4.8).

Nie wykazano istotnego wpływu stanowiska i płci jako czynników działających łącznie na poziom wszystkich analizowanych wskaźników śmierci komórkowej (tab. 4.2), odsetka komórek Mt pozytywnych (tab. 4.4) oraz zmian stężenia GSH + GSSG w gruczołach jelita środkowego *X. nemoralis* (tab. 4.6). Podobny brak zależności w odniesieniu do łącznego działania wymienionych czynników wystąpił tylko w przypadku ilościowych zmian komórek apoptotycznych (tab. 4.1) oraz aktywności SOD i CAT (tab. 4.7) w analizowanym narządzie *A. labyrinthica*. Efekty łącznego działania wszystkich czynników na wielkość analizowanych parametrów były w większości przypadków istotne statystycznie tylko w przypadku *X. nemoralis* (tab. 4.2, 4.4, 4.6, 4.8).

4.2. Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu w gruczołach jelita środkowego pająków *Agelena labyrinthica*

4.2.1. Szok termiczny

Zarówno samice, jak i samce *A. labyrinthica* reagowały na wielokrotny szok termiczny istotnym zwiększeniem odsetka komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami względem wartości kontrolnych (ryc. 4.1 B, G). Największe zmiany zanotowano u samców ze stanowiska w Olkusz, u których stres termiczny wywołał średnio 10-krotne podwyższenie wartości tego wskaźnika w odniesieniu do kontroli (ryc. 4.1 G).

Tylko u samic zebranych z okolic Pilicy zaobserwowano blisko 14-krotnie wyższą, w porównaniu z kontrolą, aktywność proteazy kaspazy podobnej. Aktywność Cas-3 w gruczołach jelita środkowego samic i samców z pozostałych grup poddanych działaniu wysokiej temperatury

nie różniła się istotnie w odniesieniu do wartości kontrolnych (ryc. 4.2 B).

Wielokrotny szok termiczny nie miał wpływu na liczbę komórek apoptotycznych w gruczołach jelita środkowego samic i samców *A. labyrinthica* (ryc. 4.3 B, G). Z kolei tylko samce tego gatunku z Olkusza charakteryzowały się 5-krotnie większą niż w grupie kontrolnej liczbą komórek nekrotycznych (ryc. 4.4 G).

Niezależnie od płci wzrosła liczba komórek Hsp70 pozytywnych u osobników z obu stanowisk (ryc. 4.5 B, G). Odsetek komórek Hsp70 pozytywnych w komórkach gruczołów jelita środkowego samców z obu stanowisk nie różnił się istotnie od wartości stwierdzonych dla samic z tych stanowisk. Stwierdzono dodatnie korelacje między liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek Hsp70 pozytywnych dla samic z obu stanowisk (Pilica, $r = 0,671$; Olkusz, $r = 0,948$) (*Aneks*¹: tab. A-1, A-2). U samców ze stanowiska zanieczyszczonego stwierdzono bardzo wysokie dodatnie zależności między stężeniem glutationu całkowitego i liczbą komórek Hsp70 pozytywnych a stopniem zmian apoptotycznych (odpowiednio: $r = 0,748$; $r = 0,939$) oraz nekrotycznych (odpowiednio: $r = 0,802$; $r = 0,954$) — tab. A-4.

W odpowiedzi na szok termiczny wykazano odpowiednio 14- i 33-krotny wzrost liczby komórek Mt pozytywnych u samic i samców ze stanowiska referencyjnego (ryc. 4.6 B). Niezależnie od płci liczba komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pajaków z Pilicy była wysoko dodatnio skorelowana z liczbą komórek Hsp70 pozytywnych w tym narządzie (samice, $r = 0,788$; samce, $r = 0,930$) — tab. A-1, A-3.

4.2.2. Pestycyd

W wyniku działania stresora chemicznego u samic pochodzących z obu stanowisk stwierdzono istotny względem wartości kontrolnych wzrost liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.1 C, H). Udokumentowa-

no wysoce istotne dodatnie korelacje między tym parametrem a aktywnością Cas-3 w narządzie samic *A. labyrinthica* niezależnie od stanowiska (Pilica, $r = 0,861$; Olkusz, $r = 0,961$) — tab. A-9, A-10. Pięciokrotna aplikacja dimetoatu nie zmieniła istotnie liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego samic z obu stanowisk w porównaniu z wartościami kontrolnymi (ryc. 4.3—4.4 C, H). W przypadku innych wskaźników śmierci komórkowej wzajemne ich korelacje wykazano tylko dla populacji ze stanowiska w Olkuszu. Dla samic ze stanowiska w Olkuszu wykazano je między liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami ($r = 0,713$) oraz między liczbą komórek apoptotycznych i aktywnością Cas-3 ($r = 0,702$) (tab. A-10). Dla tej grupy samic z Olkusza zanotowano ponadto wyższą niż w kontroli liczbę komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.5 H). Dla samic ze stanowiska w Pilicy stwierdzono dodatnie zależności między liczbą komórek Mt pozytywnych i liczbą komórek apoptotycznych ($r = 0,606$) oraz nekrotycznych ($r = 0,775$) — tab. A-9.

Jeśli chodzi o samców pochodzących z obu stanowisk, to komórkowe reakcje na stres chemiczny zaznaczyły się zwiększeniem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.1 C, H) oraz wzrostem odsetka komórek apoptotycznych (ryc. 4.3 C, H). Oba wymienione parametry pozostawały w bardzo wysokich dodatnich współzależnościach (Pilica, $r = 0,778$; Olkusz, $r = 0,936$) — tab. A-11, A-12. W gruczołach jelita środkowego samców ze stanowiska w Olkuszu stwierdzono 4-krotnie większy niż u osobników kontrolnych odsetek komórek nekrotycznych (ryc. 4.4 H). Wzajemna korelacja między wielkością tego parametru była bardzo wysoka i istotna w zestawieniu z liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w omawianym narządzie ($r = 0,947$) (tab. A-12). Dla samców z obu stanowisk udokumentowano dodatnie korelacje między liczbą komórek apoptotycznych i nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego (Pilica, $r = 0,945$; Olkusz, $r = 0,983$) — tab. A-11, A-12.

Samce z grupy P cechował wysoki odsetek komórek Mt pozytywnych, który w przypadku

¹ Tabele korelacji zamieszczono w *Aneksie* na nośniku CD.

osobników z Olkusza osiągnął wartość najwyższą ze wszystkich notowanych w innych grupach eksperymentalnych (ryc. 4.6 H). Z kolei tylko samce z Pilicy reagowały na dimetoat istotnym względem kontroli zwiększeniem liczby komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.5 C). Dla samców z obu stanowisk wykazano dodatnie korelacje między liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek Mt pozytywnych (Pilica, $r = 0,935$; Olkusz, $r = 0,941$) oraz Hsp70 pozytywnych (Pilica, $r = 0,905$; Olkusz, $r = 0,725$) — tab. A-11, A-12. Pozytywna korelacja między liczbą komórek nekrotycznych i liczbą komórek Mt pozytywnych oraz Hsp70 pozytywnych dotyczyła tylko grupy samców z Pilicy (odpowiednio: $r = 0,882$, $r = 0,944$) — tab. A-11.

4.2.3. Łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu

Efekty łącznego działania obu czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej uwidoczniły się wyraźnie w przypadku samic pochodzących z Olkusza, u których stwierdzono o 77% więcej komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.1 I), o 88% wyższą aktywność Cas-3 (ryc. 4.2 I), jak również o 72% większy odsetek komórek apoptotycznych (ryc. 4.3 I) w porównaniu z wartościami stwierdzonymi w materiale pochodzącym od osobników z grupy kontrolnej. Liczba komórek nekrotycznych u samic z tej grupy doświadczałnej utrzymywała się na poziomie zbliżonym do kontrolnego (ryc. 4.4 I). Dla samic z Olkusza udokumentowano silne dodatnie korelacje między liczbą komórek apoptotycznych i aktywnością proteazy kaspazopodobnej ($r = 0,946$), liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami ($r = 0,968$) oraz liczbą komórek nekrotycznych ($r = 0,925$) — tab. A-18.

Wpływ łącznego działania szoku termicznego i dimetoatu na komórki gruczołu jelita środkowego samic z Pilicy był znacznie słabszy i dotyczył tylko zmiany liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, których średni odsetek był blisko o 70% wyższy niż w grupie

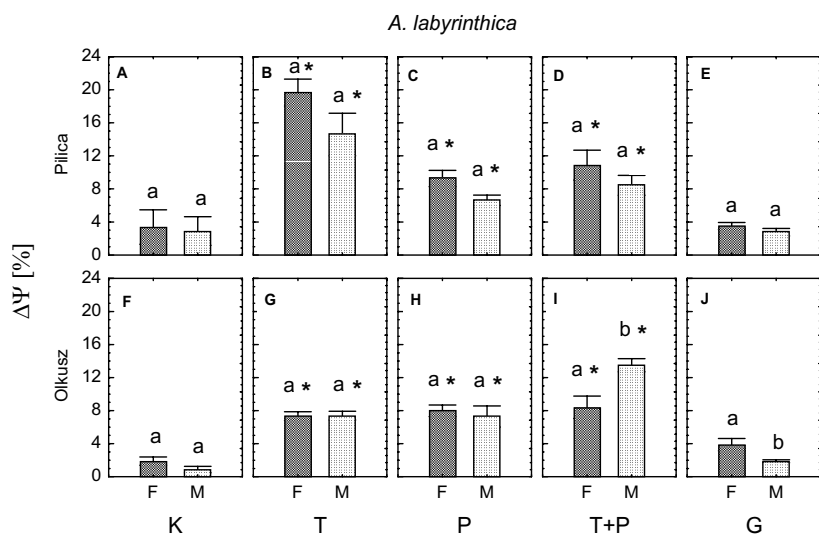
kontrolnej (ryc. 4.1 D). Dla samic z tego stanowiska udokumentowano wysoko istotną zależność między liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami ($r = 0,882$) oraz aktywnością proteazy kaspazopodobnej ($r = 0,577$) — tab. A-17.

Reakcje komórek gruczołu jelita środkowego samców *A. labyrinthica* z obu stanowisk na łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu dotyczyły wzrostu liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.1 D, I) oraz podwyższenia aktywności Cas-3 (ryc. 4.2 D, I). Istotne wzajemne korelacje między wymienionymi parametrami wykazano jednak tylko w przypadku osobników z Pilicy ($r = 0,874$) — tab. A-19.

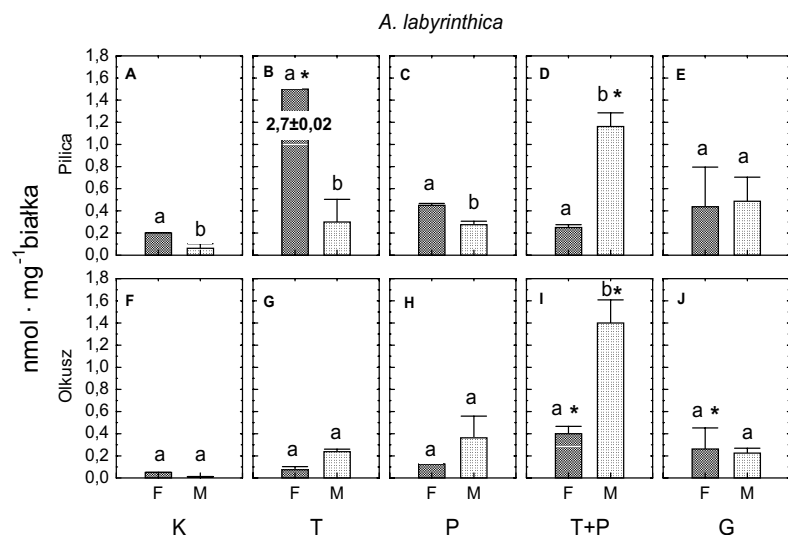
Reakcją samców z Olkusza na łączony stres było 20-krotne zwiększenie liczby komórek nekrotycznych w analizowanym narządzie względem wartości kontrolnych (ryc. 4.4 I). Dla samców z tego stanowiska udokumentowano bardzo wysokie zależności między liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami i liczbą komórek apoptotycznych ($r = 0,913$) oraz nekrotycznych ($r = 0,993$) — tab. A-20.

Samice, zależnie od stanowiska, przejawiały odmienne reakcje w odniesieniu do ilościowych zmian komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałami dla białek stresu. U samic ze stanowiska w Olkuszu charakterystyczny był istotny wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.5 I), podczas gdy u osobników pochodzących z Pilicy zanotowano istotny względem kontroli wzrost liczby komórek Mt pozytywnych (ryc. 4.6 D). Oba te parametry były dodatnio skorelowane z ilościowymi zmianami komórek apoptotycznych (Pilica, $r = 0,842$; Olkusz, $r = 0,982$) — tab. A-17, A-18.

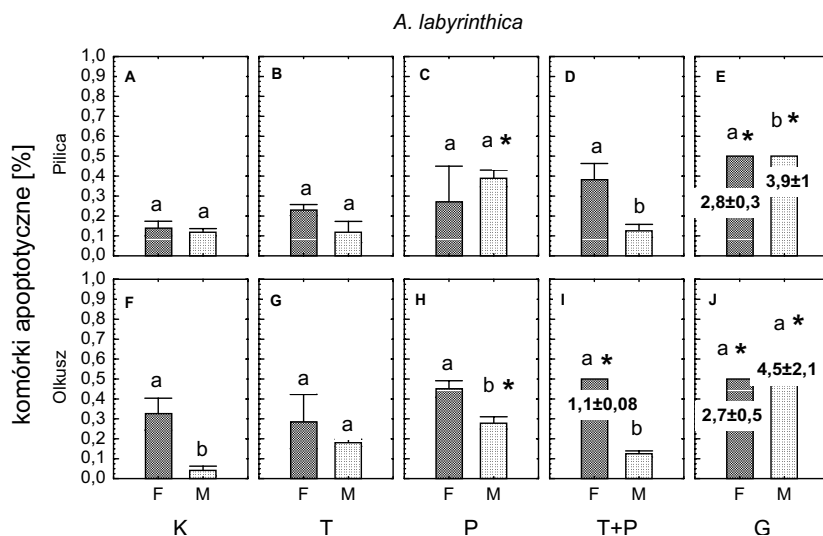
Łączne działanie szoku termicznego i dimetoatu istotnie wpłynęło na wzrost odsetka komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samców w porównaniu z grupą kontrolną, niezależnie od stanowiska (ryc. 4.6 D, I). Tylko samce z Pilicy w odpowiedzi na stres łączony miały większą niż w kontroli liczbę komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.5 D). Dla samców z obu stanowisk wykazano dodatnią korelację między liczbą komórek Mt i Hsp70 pozytywnych (Pilica, $r = 0,835$; Olkusz, $r = 0,693$) — tab. A-19, tab. A-20.



Ryc. 4.1. Odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* odłowionych w Pilicy i w Olkuszu (średnie $\pm$ SD). Grupy doświadczalne: K — kontrola (A, F), T — szok termiczny (B, G), P — pestycyd (C, H), T+P — szok termiczny i pestycyd (D, I), G — głodzenie (E, J). Różne litery (a, b) wskazują na różnice istotne statystycznie między samicami i samcami w poszczególnych grupach doświadczalnych; * wskazują różnice istotne statystycznie względem kontroli (A lub F) w obrębie płci i stano-wiska (Tukey, $p < 0,05$)

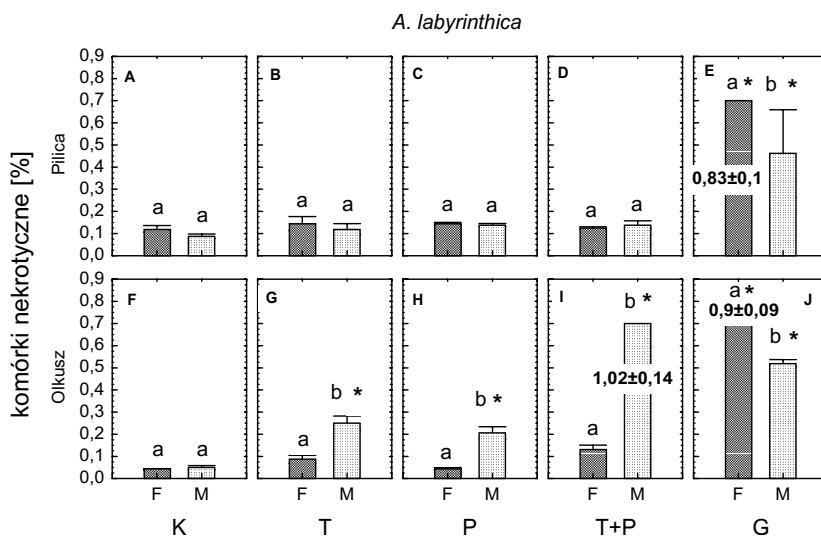


Ryc. 4.2. Aktywność proteazy kaspazopodobnej (Cas-3) w komórkach gruczołów jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

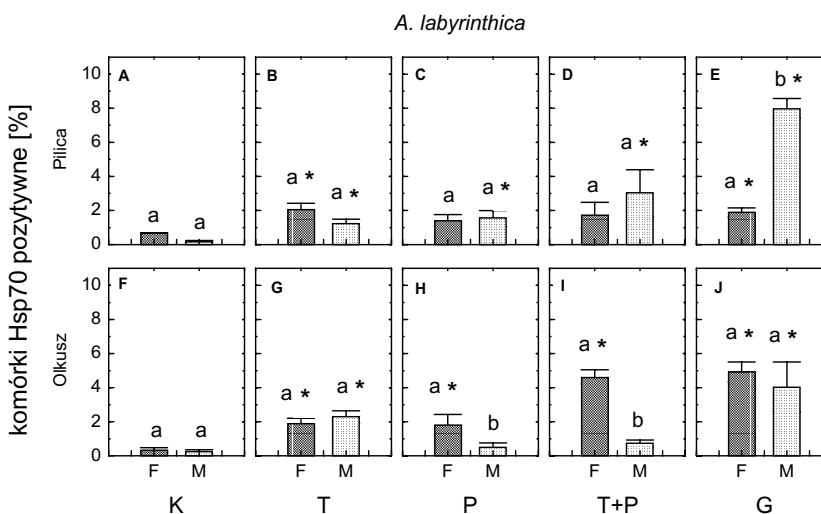


Ryc. 4.3. Apoptoza (Aneksyna⁺, PI⁺) w komórkach gruczołów jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

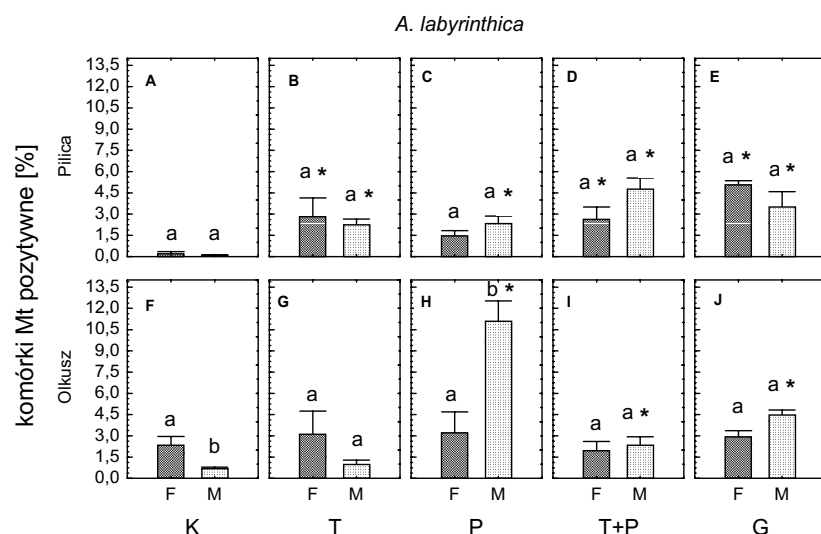
Ryc. 4.4. Nekroza (Aneksyna⁻, PI⁺) w komórkach gruczołów jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.5. Odsetek komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.6. Odsetek komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



4.2.4. Głodzenie

W wyniku głodzenia odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych u samic i u samców *A. labyrinthica* z obu stanowisk był istotnie wyższy zarówno względem wyników uzyskanych dla pajaków kontrolnych, jak i pajaków z pozostałych grup eksperymentalnych (ryc. 4.3 E, J; ryc. 4.4 E, J). Niezależnie od stanowiska, u obu płci wykazano bardzo wysokie dodatnie korelacje między tymi parametrami (Pilica: samice $r = 0,972$, samce $r = 0,684$; Olkusz: samice $r = 0,983$, samce $r = 0,859$ — tab. A-25—A-28). Głodzone samice i samce z obu stanowisk cechowały się także wysokim odsetkiem komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.5 E, J). Wzrost liczby komórek Mt pozytywnych charakteryzował większość pajaków, za wyjątkiem samic z Olkusza (ryc. 4.6 E, J). Liczba komórek nekrotycznych i apoptotycznych u samic z Pilicy była dodatnio skorelowana z liczbą komórek Hsp70 (odpowiednio, $r = 0,961$; $r = 0,954$) i Mt pozytywnych (odpowiednio, $r = 0,978$; $r = 0,987$) — tab. A-25.

Tylko w przypadku samców odłowionych na stanowisku w Pilicy stwierdzono bardzo wysokie dodatnie korelacje między liczbą komórek Hsp70 pozytywnych i liczbą komórek Mt pozytywnych ($r = 0,916$) — tab. A-27.

4.3. Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników śmierci komórkowej i białek stresu w gruczołach jelita środkowego pajaków *Xerolycosa nemoralis*

4.3.1. Szok termiczny

Działanie szoku termicznego na samice tego gatunku pochodzące ze stanowiska w Olkuszu

spowodowało istotny względem wartości kontrolnych wzrost odsetka komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego (ryc. 4.7 G). Wzrosła również aktywność proteazy kaspazopodobnej (ryc. 4.8 G) i liczba komórek nekrotycznych (ryc. 4.10 G). W przypadku samic ze stanowiska w Pilicy podobny efekt dotyczył tylko aktywności Cas-3 (ryc. 4.8 B). Reakcje komórkowe samców odłowionych w Pilicy, w odróżnieniu od samic, w odpowiedzi na stres termiczny cechowały się istotnym względem kontroli zwiększeniem liczby komórek nekrotycznych (ryc. 4.10 B). Wyraźnie wzrosła też liczba komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, a zakres tych zmian był podobny u samców z obu stanowisk (ryc. 4.7 B, G). Ilościowe zmiany liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami u osobników ze stanowiska w Pilicy korelowały istotnie z ilościowymi zmianami komórek nekrotycznych ($r = 0,656$) — tab. A-7. W przypadku samców pochodzących ze stanowiska w Olkuszu korelacje między wymienionymi parametrami były bardzo wysoko istotne ($r = 0,915$) — tab. A-8.

W wyniku działania szoku termicznego w gruczołach jelita środkowego samic i samców *X. nemoralis* stwierdzono istotne względem kontroli zwiększenie liczby komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.11 B, G). W przypadku samców ze stanowiska w Pilicy liczba komórek Hsp70 pozytywnych wzrosła powyżej wartości kontrolnych blisko 4-krotnie, a w przypadku osobników z Olkusza nawet 6-krotnie. Średni odsetek komórek Hsp70 pozytywnych, niezależnie od stanowiska, był nieznacznie niższy u samic niż u samców. W odniesieniu do wartości kontrolnych uzyskanych u samic z Pilicy różnica sięgała 130%, lecz u samic z Olkusza aż 410% (ryc. 4.11 B, G).

Jedynie dla samic odłowionych w Olkuszu zanotowano istotny względem wartości kontrolnych wzrost odsetka komórek Mt pozytywnych (ryc. 4.12 G). Liczba komórek Mt pozytywnych stwierdzona u tych osobników była bardzo wysoko dodatnio skorelowana z liczbą komórek Hsp70 pozytywnych ($r = 0,913$) — tab. A-6.

Liczba komórek apoptotycznych, a także nekrotycznych u samic z Olkusza była dodatnio skorelowana z liczbą komórek Mt pozytywnych (odpowiednio: $r = 0,822$; $r = 0,912$) i z liczbą komórek Hsp70 pozytywnych (odpowiednio: $r = 0,868$; $r = 0,977$) — tab. A-6. Dla samic z Pilicy udokumentowano dodatnie zależności między liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek Hsp70 pozytywnych ($r = 0,622$) — tab. A-5.

4.3.2. Pestycyd

Zastosowanie dimetoatu u samic z obu stanowisk manifestowało się zwiększeniem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 C, H), jak również wzrostem liczby komórek nekrotycznych (ryc. 4.10 C, H). Stwierdzono wysoce istotne dodatnie korelacje między tymi wskaźnikami u samic niezależnie od stanowiska (Pilica — $r = 0,909$; Olkusz — $r = 0,974$) — tab. A-13, tab. A-14. Tylko w przypadku samic odłowionych w Olkuszu zanotowano ponadto 24-krotnie wyższą aktywność proteazy kaspazopodobnej niż u pajaków nie traktowanych pestycydem (ryc. 4.8 H). Aktywność Cas-3 u samic z Olkusza była silnie skorelowana zarówno z liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami ($r = 0,909$), jak i z liczbą komórek nekrotycznych ($r = 0,921$) — tab. A-14.

Samice z obu stanowisk cechowały się istotnym względem kontroli zwiększeniem liczby komórek Mt pozytywnych, przy czym reakcje samic z Pilicy w odniesieniu do wymienionego parametru były ponad 2-krotnie silniejsze niż w przypadku osobników z Olkusza, przy zbliżonych wartościach tego wskaźnika u pajaków z grupy kontrolnej (ryc. 4.12 C, H). Dla pajaków ze stanowiska w Pilicy udokumentowano dodatnie korelacje między liczbą komórek Mt pozytywnych oraz liczbą komórek nekrotycznych ($r = 0,953$) i apoptotycznych ($r = 0,770$) — tab. A-13.

W grupie samców znaczące efekty działania pestycydu zanotowano głównie w przypadku

osobników z Pilicy, u których nastąpiło istotne względem kontroli zwiększenie liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 C) oraz liczby komórek nekrotycznych (ryc. 4.10 C). Ilościowe zmiany obu wymienionych parametrów były skorelowane dodatnio ($r = 0,898$) — tab. A-15. W przypadku samców z Olkusza zmiany wskaźników śmierci komórkowej w odpowiedzi na zastosowany ksenobiotyk były słabo zaznaczone, za wyjątkiem blisko 20-krotnego zwiększenia liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 H). Pajaki te cechowało ponadto blisko 5-krotne zwiększenie liczby komórek Hsp70 pozytywnych w porównaniu z wartościami kontrolnymi (ryc. 4.11 H). Stopień tej odpowiedzi był zbliżony do reakcji wywołanej działaniem szoku termicznego, a także łącznego działania szoku termicznego wraz z pestycydem. Liczba komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samców z Olkusza była dodatnio skorelowana z liczbą komórek Mt pozytywnych ($r = 0,610$) — tab. A-16.

Samce pochodzące ze stanowiska referencyjnego cechował istotny względem wartości kontrolnych wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.11 C) i Mt pozytywnych (ryc. 4.12 C). Jeśli weźmie się pod uwagę drugi z wymienionych parametrów, to efekt działania dimetoatu w zestawieniu z pozostałymi stresorami był zdecydowanie silniejszy, ponieważ odsetek komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samców z tego stanowiska był blisko 4-krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej i średnio 2-krotnie przewyższał ich udział wykazany w pozostałych grupach doświadczalnych (ryc. 4.12 C).

4.3.3. Łączne działanie wysokiej temperatury i pestycydu

Łączne działanie obu stresorów wywołało w gruczołach jelita środkowego samic *X. nemorialis* ze stanowiska w Olkuszu blisko 14-krotny wzrost liczby komórek ze zdepolaryzowanymi

mitochondriami (ryc. 4.7 I) oraz 19-krotny wzrost liczby komórek nekrotycznych (ryc. 4.10 I). Oba parametry pozostawały w wysokich dodatnich zależnościach ($r = 0,996$) — tab. A-22. Także aktywność Cas-3 i liczba komórek Mt pozytywnych były w tej grupie samic istotnie wyższe niż u pajaków z grupy kontrolnej (ryc. 4.8 I; ryc. 4.12 I).

Łączne działanie obu stresorów u samic odłowionych z Pilicy wywołało jakościowo podobne zmiany do samic z Olkusza, aczkolwiek ich stopień był istotnie niższy. U samic ze stanowiska w Pilicy zarejestrowano ponad 10-krotny względem kontroli wzrost odsetka komórek apoptotycznych (ryc. 4.9 D), a odsetek komórek nekrotycznych oraz Mt pozytywnych wzrósł u tych pajaków odpowiednio ponad 9-krotnie i 4-krotnie (ryc. 4.10 D; ryc. 4.12 D). Dodatkowo korelacje stwierdzono między liczbą komórek Mt pozytywnych i liczbą komórek nekrotycznych ($r = 0,889$) oraz apoptotycznych ($r = 0,714$) — tab. A-21.

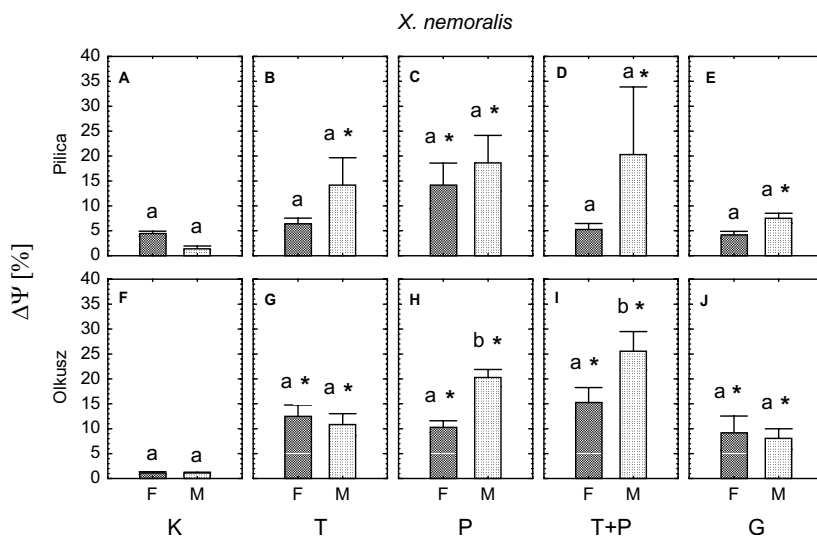
Samce z obu stanowisk miały większą niż w kontroli liczbę komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 D, I) oraz liczbę komórek nekrotycznych (ryc. 4.10 D, I). U przedstawicieli tej płci z Olkusza zanotowano także zwiększenie liczby komórek apoptotycznych (ryc. 4.9 I). Niezależnie od stanowiska samce reagowały wzrostem liczby komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.11 D, I). U samców z obu stanowisk wykazano pozytywne zależności między liczbą komórek nekrotycznych i liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (Pilica, $r = 0,706$; Olkusz, $r = 0,985$), jak również między liczbą komórek nekrotycznych i aktywnością Cas-3 (Pilica, $r = 0,812$; Olkusz, $r = 0,955$). Bardzo silne dodatnie korelacje między liczbą komórek nekrotycznych i liczbą komórek apoptotycznych w analizowanym narządzie samców stwierdzono niezależnie od stanowiska (Pilica, $r = 0,944$; Olkusz, $r = 0,966$) — tab. A-23, tab. A-24.

4.3.4. Głodzenie

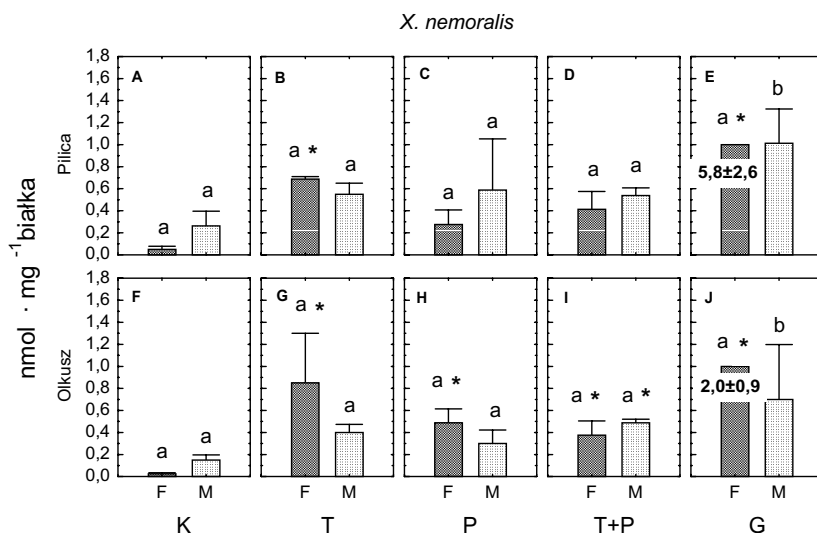
W porównaniu z pozostałymi czynnikami stresogennymi głodzenie wywoływało największy efekt w odniesieniu do proteazy kaspazopodobnej, której aktywność silnie wzrosła u samic niezależnie od stanowiska (ryc. 4.8 E, J). Wzrósł również odsetek komórek apoptotycznych u wszystkich pajaków bez względu na ich płeć oraz miejsce odłowu (ryc. 4.9 E, J). Wartości obu wymienionych parametrów były dodatnio skorelowane u samic niezależnie od stanowiska (Pilica, $r = 0,780$; Olkusz, $r = 0,942$) (tab. A-29, tab. A-30) oraz u samców z Pilicy ($r = 0,892$) (tab. A-31). Dla samic z obu stanowisk znamienne było także istotne względem kontroli zwiększenie liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 E, J). W odpowiedzi na głodzenie w gruczołach jelita środkowego samic wzrósł ponadto odsetek komórek Mt pozytywnych, przy czym zmiany te były większe w przypadku osobników z Olkusza (ryc. 4.12 J). Tylko u samic ze stanowiska w Olkuszu stwierdzono ujemne korelacje między liczbą komórek Mt pozytywnych i liczbą komórek Hsp70 pozytywnych ($r = -0,664$) — tab. A-30.

Wpływ głodzenia na zmiany wskaźników śmierci komórkowej był podobny u samców z obu stanowisk (Olkusz i Pilica), co przejawiało się zwiększeniem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 E, J) oraz liczby komórek apoptotycznych (ryc. 4.9 E, J) i nekrotycznych (ryc. 4.10 E, J). W odniesieniu do dwóch ostatnich parametrów skutki głodzenia były średnio o 30% większe u samców ze stanowiska w Olkuszu niż u osobników ze stanowiska w Pilicy. Niemniej w obu populacjach samców stwierdzono bardzo silne korelacje między liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami i liczbą komórek apoptotycznych (Pilica, $r = 0,972$; Olkusz, $r = 0,954$) oraz nekrotycznych (Pilica, $r = 0,688$; Olkusz, $r = 0,798$) (tab. A-31, tab. A-32). Tylko u samców pochodzących z Pilicy wzrosła liczba komórek Hsp70 pozytywnych (ryc. 4.11 E). Udokumentowano, że była ona dodatnio skorelowana z liczbą komórek Mt pozytywnych u samców z tego stanowiska ($r = 0,606$) — tab. A-31.

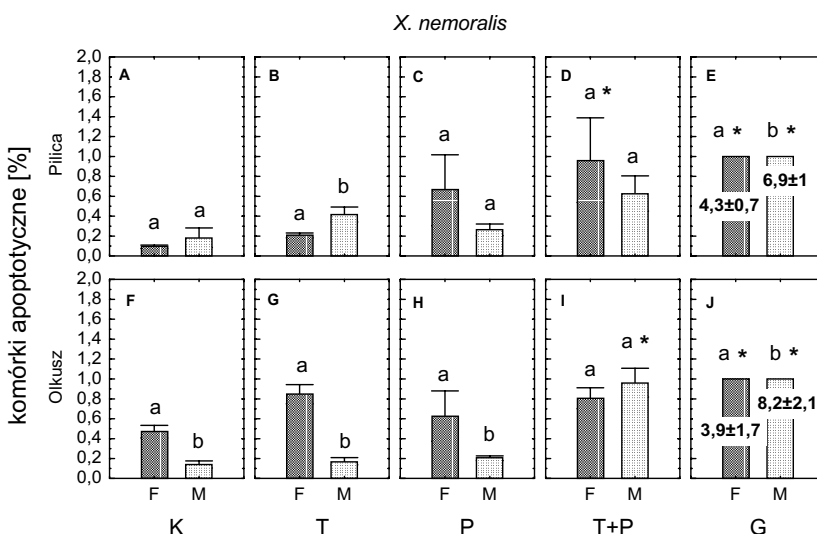
Ryc. 4.7. Odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

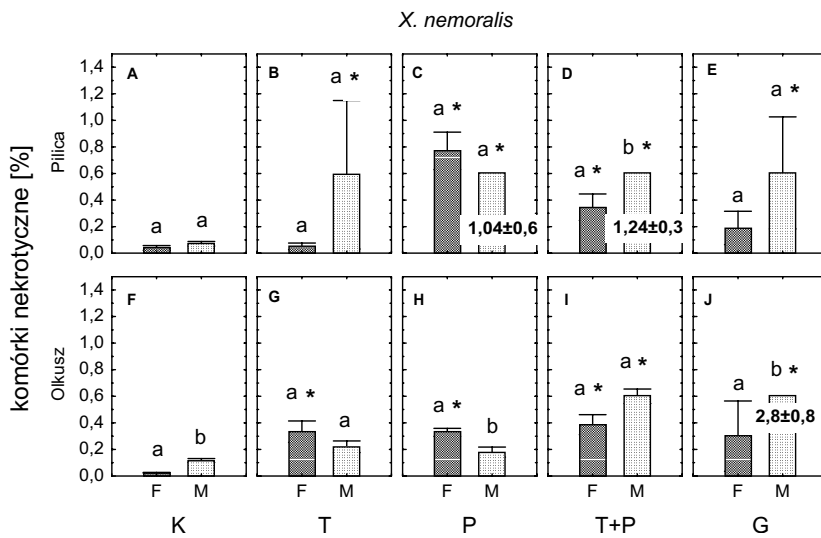


Ryc. 4.8. Aktywność proteazy kaspazopodobnej (Cas-3) w komórkach gruczołów jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

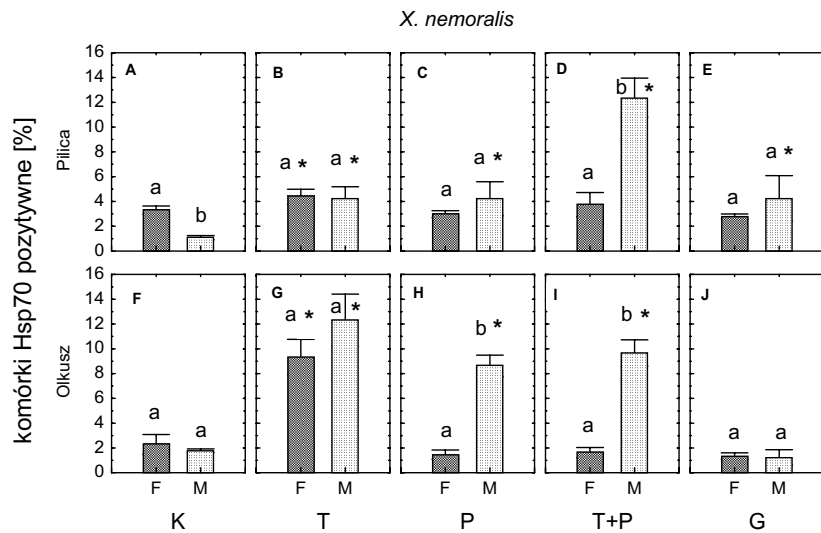


Ryc. 4.9. Apoptoza (Aneksyna⁺, PI⁺) w komórkach gruczołów jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

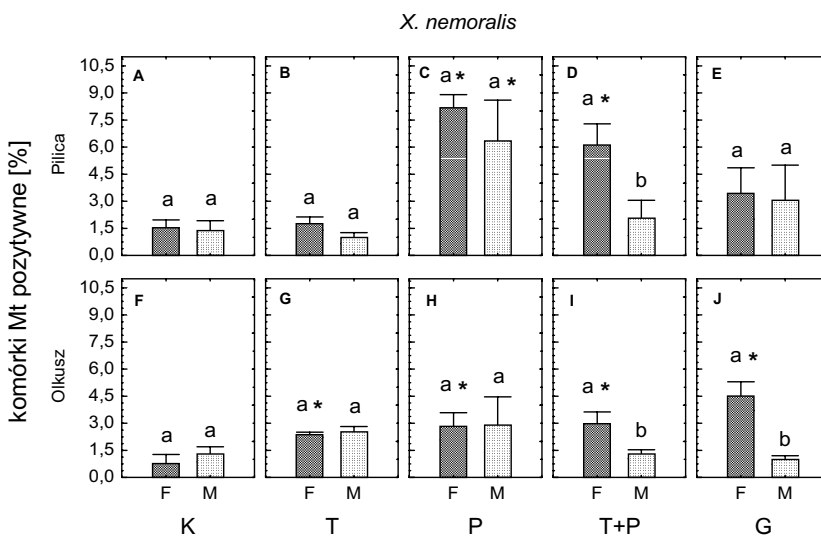




Ryc. 4.10. Nekroza (Aneksyna⁻, PI⁺) w komórkach gruczołów jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie ± SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.11. Odsetek komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie ± SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.12. Odsetek komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie ± SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

4.4. Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego pająków *Agelena labyrinthica*

4.4.1. Szok termiczny

W wyniku zastosowania szoku termicznego stężenie glutationu całkowitego u samic z obu stanowisk było prawie 5-krotnie wyższe w porównaniu z wartościami z grupy kontrolnej (ryc. 4.13 B, G) i wysoko pozytywnie skorelowane z liczbą komórek Hsp70 pozytywnych w analizowanym narządzie (Pilica, $r = 0,975$; Olkusz, $r = 0,727$) — tab. A-1, tab. A-2.

Wartości aktywności GPOX (ryc. 4.14 B, G), GSTPx (ryc. 4.15 B, G), GST (ryc. 4.16 B, G) i SOD (ryc. 4.17 B, G) w gruczołach jelita środkowego samic nie różniły się istotnie od wartości kontrolnych. Istotnie względem kontroli wzrosła natomiast aktywność CAT u samic, lecz tylko u osobników z Pilicy (ryc. 4.18 B).

Wartość aktywności GST ze stanowiska w Pilicy była wyższa u samców niż u samic (ryc. 4.16 B), lecz różnice istotne statystycznie względem kontroli stwierdzono tylko u samców z Olkusza (ryc. 4.16 G).

Samce z obu stanowisk charakteryzowały się istotnie wyższą aktywnością SOD niż samice (ryc. 4.17 B, G), ale w przypadku samców z Pilicy była ona istotnie niższa niż w kontroli (ryc. 4.17 B). Tylko dla samców ze stanowiska w Olkuszu udokumentowano ujemną korelację między stężeniem glutationu i aktywnością GPOX ($r = -0,651$) — tab. A-4.

4.4.2. Pestycyd

W przypadku samic odłowionych w Olkuszu dimetoat wpłynął na wzrost stężenia glutationu

(4-krotnie) (ryc. 13 H), podwyższenie aktywności GPOX (1,6-krotnie) (ryc. 4.14 H), a także istotne obniżenie aktywności GSTPx (0,3-krotnie) (ryc. 4.15 H) względem kontroli. Aktywność obu peroksydaz glutationowych była ujemnie skorelowana ze sobą ($r = -0,647$) — tab. A-10. Wysoko dodatnią korelację wykazano natomiast między stężeniem glutationu i aktywnością GPOX u przedstawicieli tej płci z Olkusza ($r = 0,819$) — tab. A-10.

W przypadku samic pochodzących z Pilicy nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniu glutationu całkowitego oraz w aktywności peroksydaz glutationowych po aplikacji dimetoatu (ryc. 4.13 C; ryc. 4.14 C; ryc. 4.15 C). Pestycyd nie wpłynął na aktywność SOD i CAT u samic z obu stanowisk (ryc. 4.17 C, H; ryc. 4.18 C, H). Aktywność SOD oraz stężenie glutationu w gruczołach jelita środkowego samic ze stanowiska w Pilicy były dodatnio skorelowane z ilością komórek nekrotycznych (odpowiednio: $r = 0,740$; $r = 0,958$) — tab. A-9.

Enzymatyczne reakcje antyoksydacyjne samców na zastosowany pestycyd były słabe i niezależne od stanowiska. W odniesieniu do pająków z Olkusza zanotowano nasilenie aktywności GPOX (ryc. 4.15 H) i GST (ryc. 4.16 C). Efekt działania dimetoatu na reakcje antyoksydacyjne samców z Pilicy wiązał się natomiast ze wzrostem stężenia GSH + GSSG (ryc. 4.13 C) oraz aktywności GSTPx (ryc. 4.15 C). Aktywność zarówno SOD, jak i CAT utrzymywała się u przedstawicieli tej płci na zbliżonym poziomie, porównywalnym z tym uzyskanym dla grupy kontrolnej, niezależnie od stanowiska (ryc. 4.17 C, H; ryc. 4.18 C, H). Analiza korelacji wykazała dla samców z Pilicy wiele wzajemnych zależności między parametrami antyoksydacyjnymi związanymi z metabolizmem glutationu oraz między wskaźnikami śmierci komórkowej a białkami stresu i parametrami antyoksydacyjnymi (tab. A-11). W przypadku samców z Olkusza zmiany apoptotyczne w analizowanym narządzie były dodatnio skorelowane ze stężeniem GSH + GSSG ($r = 0,840$) i aktywnością GPOX ($r = 0,949$) — tab. A-12.

4.4.3. Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu

Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu nasiliło u samic syntezę glutationu niezależnie od stanowiska (ryc. 4.13 D, I). Stężenie tego tripeptydu w porównaniu z jego stężeniem w grupach kontrolnych było 3-krotnie wyższe u osobników odłowionych z Pilicy i blisko 4-krotnie wyższe u samic z Olkusza. W przypadku samic kierunek zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych związanych z metabolizmem glutationu zależał od stanowiska. Samice z Pilicy cechowało istotne względem kontroli obniżenie aktywności GPOX (ryc. 4.14 D) i GST (ryc. 4.16 D) oraz podwyższenie aktywności GSTPx (ryc. 4.15 D). Samice ze stanowiska w Olkuszu miały istotnie wyższą aktywność GPOX (ryc. 4.14 I) i obniżoną aktywność GSTPx (ryc. 4.15 I) względem wartości kontrolnych. W przypadku samic z Pilicy aktywność GPOX była ujemnie skorelowana ze stężeniem GSH + GSSG ($r = -0,927$) oraz z aktywnością GSTPx ($r = -0,619$) (tab. A-17), podczas gdy u samic z Olkusza aktywność GPOX była dodatnio skorelowana ze stężeniem glutationu ($r = 0,909$) oraz ujemnie skorelowana z aktywnością CAT ($r = -0,774$) (tab. A-18). Tylko w przypadku samic z Olkusza stwierdzono ujemne korelacje liczby komórek nekrotycznych i apoptotycznych z aktywnością CAT (odpowiednio, $r = -0,893$; $r = -0,861$) oraz liczby komórek apoptotycznych z aktywnością GSTPx ($r = -0,665$) — tab. A-18.

Łączne działanie obu czynników stresogennych u samców z Olkusza spowodowało wzrost stężenia glutationu istotny względem wartości kontrolnych (ryc. 4.13 I). Dotyczyło to również aktywności GPOX (ryc. 4.14 I), GSTPx (ryc. 4.15 I) i GST (ryc. 4.16 I). W tej grupie pajaków znaleziono wiele wzajemnych dodatnich korelacji między analizowanymi parametrami antyoksydacyjnymi związanymi z metabolizmem glutationu oraz między liczbą komórek apoptotycznych i nekrotycznych (tab. A-20).

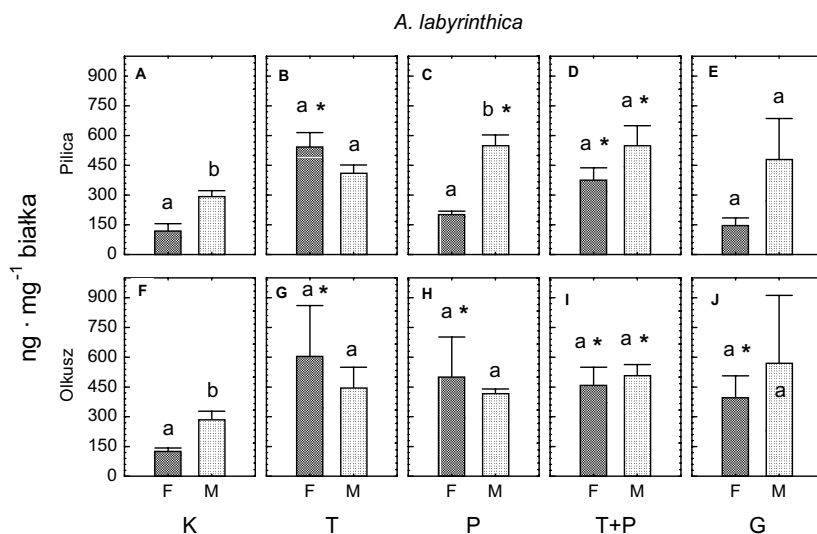
Zmiany odpowiedzi antyoksydacyjnych, które stwierdzono u samców *A. labyrinthica* z Pilicy dotyczyły głównie wzrostu stężenia glutationu całkowitego (ryc. 4.13 D) i aktywności GSTPx (ryc. 4.15 D). Stężenie glutationu było dodatnio skorelowane z ilościowymi zmianami komórek nekrotycznych ($r = 0,909$) — tab. A-19.

4.4.4. Głodzenie

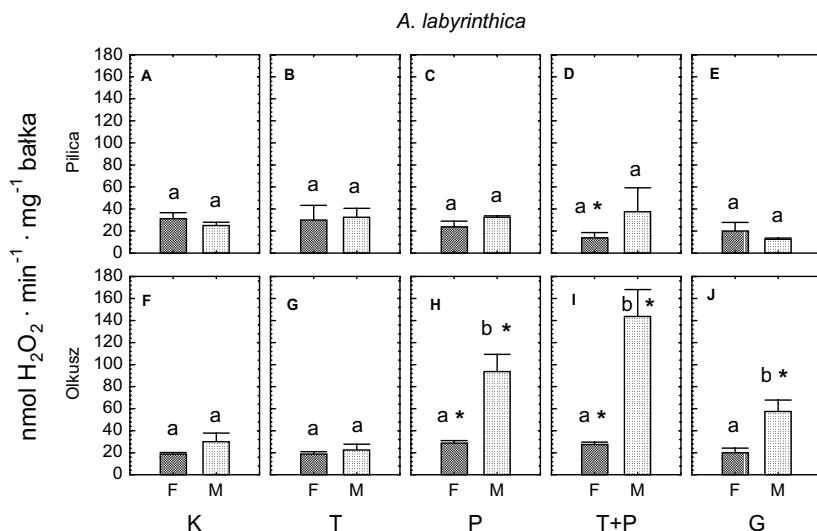
W odniesieniu do zmian parametrów antyoksydacyjnych w warunkach głodzenia wykazano różnice zależne od płci pajaków. Samice z Olkusza cechowały się istotnym względem kontroli wzrostem stężenia glutationu całkowitego (ryc. 4.13 J), podczas gdy aktywność GPOX nie zmieniła się (ryc. 4.14 J), a aktywność GSTPx zmalała istotnie o prawie 50% (ryc. 4.15 J). Dla grupy samic z Pilicy zanotowano istotny względem kontroli wzrost aktywności GST (ryc. 4.16 E). W warunkach niedoboru pokarmu, niezależnie od stanowiska, aktywność SOD utrzymywała się u samic na poziomie bliskim kontrolnemu (ryc. 4.17 E, J), a aktywność CAT była o blisko 50% niższa (ryc. 4.18 E, J). Liczba komórek nekrotycznych i apoptotycznych u samic z tego stanowiska była ujemnie skorelowana z aktywnością CAT (odpowiednio: $r = -0,841$; $r = -0,906$) — tab. A-25.

Głodzenie wpłynęło na podwyższenie aktywności GPOX (ryc. 4.14 J) i obniżenie aktywności SOD u samców z Olkusza (ryc. 4.17 J). W przypadku osobników tej grupy doświadczalnej stwierdzono dodatnie korelacje między aktywnością SOD i CAT ($r = 0,586$), a także między aktywnością GPOX i GSTPx ($r = 0,764$) — tab. A-28. Samce z Pilicy w odpowiedzi na głodzenie zareagowały podwyższeniem aktywności GSTPx (ryc. 4.15 E) i obniżeniem aktywności GST (ryc. 4.16 J). Dla pajaków z tego stanowiska wykazano ujemne korelacje między aktywnością obu peroksydaz glutationowych ($r = -0,902$) — tab. A-27.

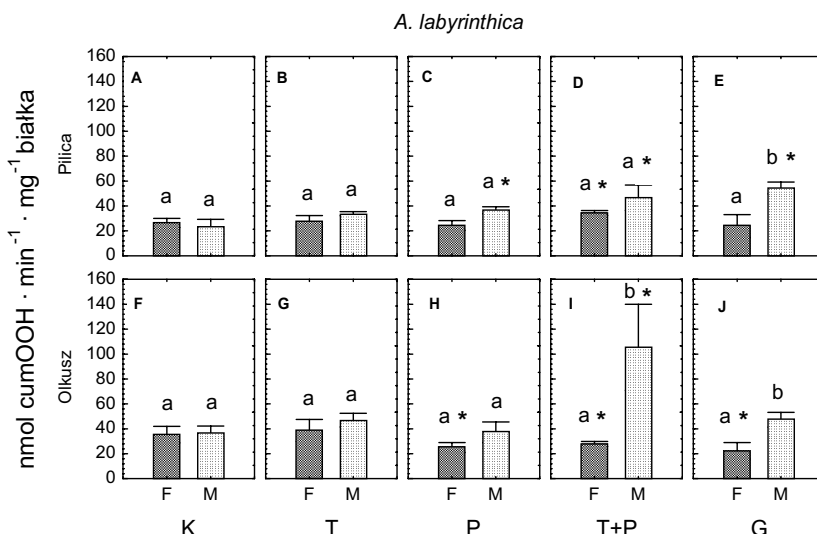
Ryc. 4.13. Stężenie glutationu (GSH + GSSG) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

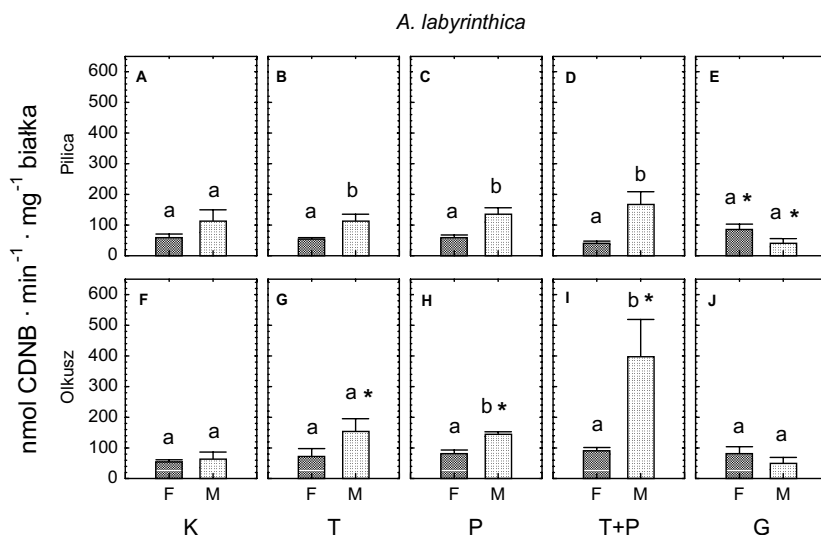


Ryc. 4.14. Aktywność peroksydazy selenozależnej (GPOX) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

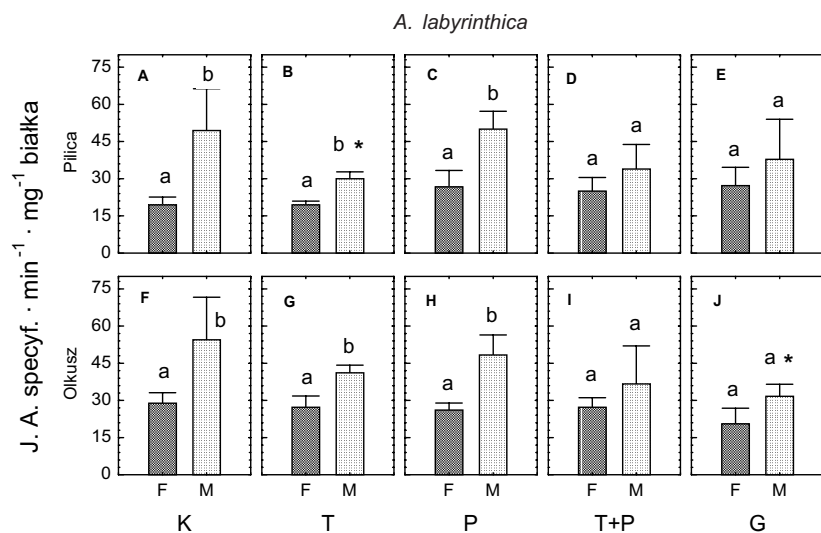


Ryc. 4.15. Aktywność peroksydazy niezależnej od selenu (GSTPx) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

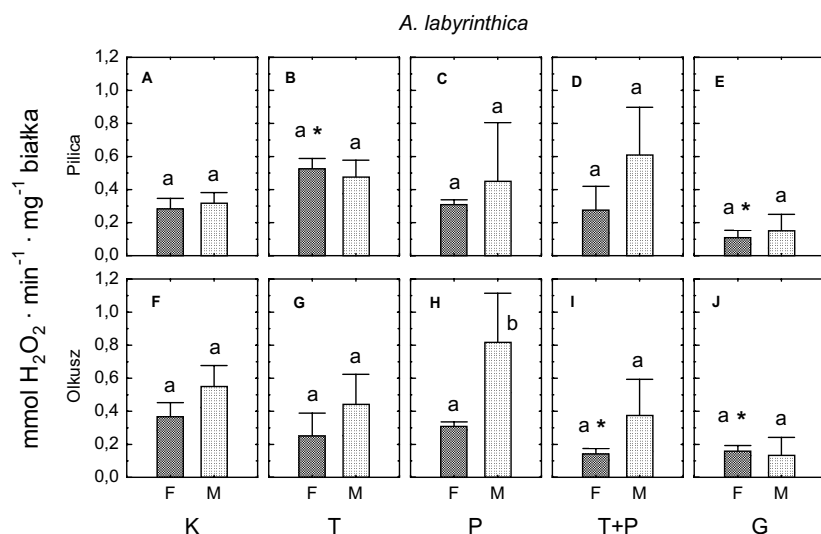




Ryc. 4.16. Aktywność *S*-transferazy glutationowej (GST) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.17. Aktywność dysmutazy ponadtlenukowej (SOD) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.18. Aktywność katalazy (CAT) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

4.5. Efekty zastosowanych czynników stresogennych w odniesieniu do wskaźników antyoksydacyjnych w gruczołach jelita środkowego pajaków *Xerolycosa nemoralis*

4.5.1. Szok termiczny

Działanie szoku termicznego (T) manifestowało się istotnym względem wartości kontrolnych zwiększeniem stężenia glutationu (ryc. 4.19 G) w gruczołach jelita środkowego samic z Olkusza. W narządzie tym u samic pochodzących z Olkusza 2-krotnie obniżyła się aktywność GPOX (ryc. 4.20 G) i 3-krotnie GSTPx (ryc. 4.21 G) w porównaniu z wartościami uzyskanymi w grupie kontrolnej. Nasileniu uległa natomiast aktywność SOD i CAT (ryc. 4.23 G; ryc. 4.24 G). U samic z tego stanowiska wykazano silną dodatnią korelację między aktywnością SOD i CAT ($r = 0,889$) oraz ujemną korelację między stężeniem glutationu i aktywnością GST ($r = -0,966$), GPOX ($r = -0,752$) i GSTPx ($r = -0,742$) — tab. A-6. Ponadto liczba komórek nekrotycznych i apoptotycznych była ujemnie skorelowana z aktywnością obu peroksydaz glutationowych (tab. A-6).

Reakcje samic z Pilicy na szok termiczny wiązały się głównie z nasileniem aktywności GSTPx (ryc. 4.21 B), SOD (ryc. 4.23 B) i CAT (ryc. 4.24 B). W przypadku pajaków z tego stanowiska charakterystyczna była dodatnia korelacja między aktywnością SOD i CAT ($r = 0,623$), a także silna korelacja między aktywnością CAT i GSTPx ($r = 0,904$) (tab. A-5). Aktywność SOD i CAT, a także stężenie glutationu były dodatnio skorelowane z liczbą komórek Hsp70 pozytywnych (odpowiednio: $r = 0,902$; $r = 0,633$; $r = 0,622$). Podobne pozytywne zależności dotyczyły także liczby komórek apoptotycznych w odniesieniu do aktywności CAT ($r = 0,920$), GST ($r = 0,747$) i GSTPx ($r = 0,896$) — tab. A-5.

W przypadku samców ze stanowiska w Olkuszu wymieniony stresor istotnie, w porówna-

niu z uzyskanymi wartościami dla grupy kontrolnej, nasilał aktywność GST i CAT (ryc. 4.22 G; ryc. 4.24 G). U samców z tego stanowiska potwierdzono dodatnie korelacje między liczbą komórek nekrotycznych i apoptotycznych a aktywnością CAT (odpowiednio: $r = 0,633$; $r = 0,625$) — tab. A-8. Natomiast u samców ze stanowiska w Pilicy reakcje antyoksydacyjne spowodowane stresem termicznym manifestowały się wzrostem stężenia glutationu (ryc. 4.19 B) oraz nasileniem aktywności GSTPx (ryc. 4.21 B), GST (ryc. 4.22 B), SOD (ryc. 4.23 B) i CAT (ryc. 4.24 B). Parametry te były wzajemne, silnie lub bardzo silnie skorelowane (tab. A-7).

4.5.2. Pestycyd

Aktywność obu peroksydaz glutationowych GPOX i GSTPx u samic ze stanowiska w Olkuszu, intoksykowanych dimetoatem, zmalała względem wartości uzyskanych dla grup kontrolnych (ryc. 4.20 H; ryc. 4.21 H). U tych osobników nasiliły się enzymatyczne reakcje antyoksydacyjne związane z aktywnością SOD i CAT, charakteryzowała je też wysoka dodatnia korelacja r wynosząca 0,975 (ryc. 4.23 H; ryc. 4.24 H; tab. A-14). U samic z tego stanowiska wykazano ujemne zależności między liczbą komórek nekrotycznych oraz GST ($r = -0,626$), GPOX ($r = -0,692$), GSTPx ($r = -0,987$), a zależności dodatnie między liczbą komórek nekrotycznych i aktywnością SOD ($r = 0,895$) oraz CAT ($r = 0,961$) (tab. A-14).

W przypadku samic pochodzących z Pilicy nasileniu uległy jedynie reakcje sprzęgania katalizowane przez GST (ryc. 4.22 C), podczas gdy aktywność innych enzymów antyoksydacyjnych utrzymywała się na stałym poziomie, bliskim wartościom z grupy kontrolnej. Aktywność GST była dodatnio skorelowana ze stężeniem glutationu całkowitego ($r = 0,767$) — tab. A-13. W gruczołach jelita środkowego samic z Pilicy wzrostowi liczebności komórek apoptotycznych i nekrotycznych towarzyszyło podwyższenie ak-

tywności enzymów związanych z metabolizmem glutationu (tab. A-13).

W przypadku samców ze stanowiska w Olkuszu odnotowano wzrost stężenia glutationu całkowitego (ryc. 4.19 H) oraz aktywności GPOX (ryc. 16 H), GSTPx (ryc. 4.21 H) i CAT (ryc. 4.24 H). Stężenie glutationu było dodatnio skorelowane z aktywnością GPOX ($r = 0,881$), GSTPx ($r = 0,844$) i GST ($r = 0,949$) — tab. A-16. U samców z Olkusza wykazano ponadto dodatnie korelacje między liczbą komórek apoptotycznych, nekrotycznych i aktywnością CAT (odpowiednio: $r = 0,797$; $r = 0,868$), GPOX (odpowiednio: $r = 0,788$; $r = 0,726$) oraz stężeniem glutationu (odpowiednio: $r = 0,824$; $r = 0,762$) — tab. A-16.

Dimetoat spowodował istotny względem wartości kontrolnych wzrost stężenia glutationu całkowitego (ryc. 4.19 C), zwiększenie aktywności GPOX (ryc. 4.20 C), GSTPx (ryc. 4.21 C), GST (ryc. 4.22 C), SOD (ryc. 4.23 C) i CAT (ryc. 4.24 C) u samców z Pilicy. Dla tej grupy pajaków wykazano dodatnie zależności między aktywnością SOD i CAT ($r = 0,707$) oraz między stężeniem GSH + GSSG i aktywnością GPOX ($r = 0,778$), GSTPx ($r = 0,626$) i GST ($r = 0,689$) — tab. A-15. W grupie samców z Pilicy traktowanej dimetoatem liczba komórek nekrotycznych była dodatnio skorelowana z aktywnością SOD ($r = 0,862$), CAT ($r = 0,679$) oraz ze stężeniem glutationu ($r = 0,841$) — tab. A-15.

4.5.3. Łączne działanie szoku termicznego i pestycydu

W przypadku samic ze stanowiska w Olkuszu aktywność GPOX i GSTPx obniżyła się (ryc. 4.20 I, ryc. 4.21 I), podczas gdy aktywność SOD wzrosła względem wartości kontrolnych (ryc. 4.23 I). Aktywność SOD u samic z Olkusza była silnie dodatnio skorelowana z aktywnością CAT ($r = 0,975$), gdy tymczasem aktywność CAT z GPOX ($r = -0,701$) oraz stężenie glutationu i aktywność GST ($r = -0,820$) cechowała silnie ujemna korelacja (tab. A-22). Dodat-

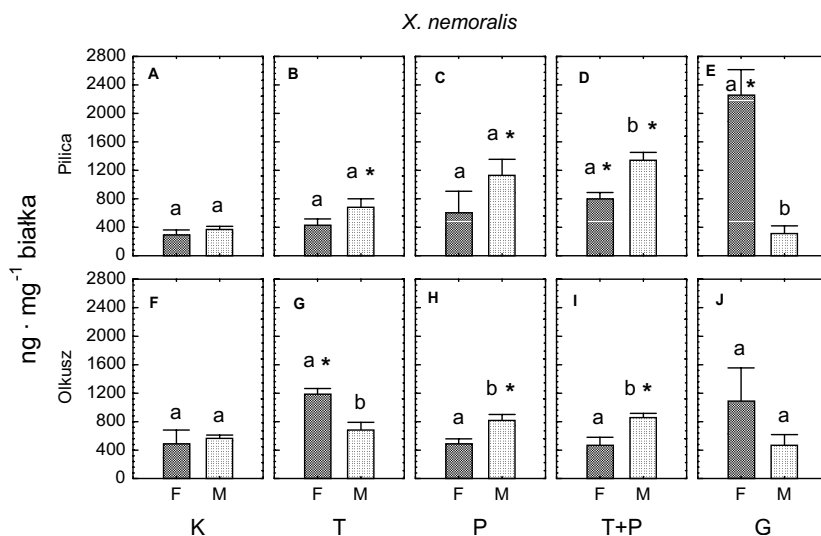
nie korelacje między ilościowymi zmianami komórek nekrotycznych i apoptotycznych a aktywnością SOD (odpowiednio: $r = 0,969$; $r = 0,911$) i CAT (odpowiednio: $r = 0,980$; $r = 0,904$) oraz ujemne korelacje między wymienionymi wskaźnikami śmierci komórkowej i aktywnością GPOX (odpowiednio: $r = -0,688$; $r = -0,620$) oraz GSTPx (odpowiednio: $r = -0,769$; $r = -0,633$) dotyczyły samic z Olkusza (tab. A-22). Samice pochodzące z Pilicy reagowały wzrostem stężenia glutationu całkowitego (ryc. 4.19 D) i nasileniem aktywności CAT (ryc. 4.24 D). Dla samic z tego stanowiska udokumentowano bardzo wysoką dodatnią korelację między aktywnością SOD i aktywnością CAT ($r = 0,814$) oraz ujemną korelację między stężeniem glutationu i aktywnością GSTPx ($r = -0,589$) — tab. A-21.

Samce, niezależnie od stanowiska, zareagowały wzrostem stężenia glutationu (ryc. 4.19 D, I) oraz podwyższeniem aktywności GSTPx (ryc. 4.21 D, I), GST (ryc. 4.22 D, I) i CAT (ryc. 4.24 D, I). W przypadku samców z Pilicy łączne działanie obu stresorów też było związane ze wzrostem aktywności GPOX (ryc. 4.20 D) i SOD (ryc. 4.23 D). Niezależnie od stanowiska, w odniesieniu do samców, analiza korelacji potwierdziła wiele istotnych zależności między aktywnością enzymów antyoksydacyjnych oraz między parametrami antyoksydacyjnymi i wskaźnikami śmierci komórkowej (tab. A-23, tab. A-24).

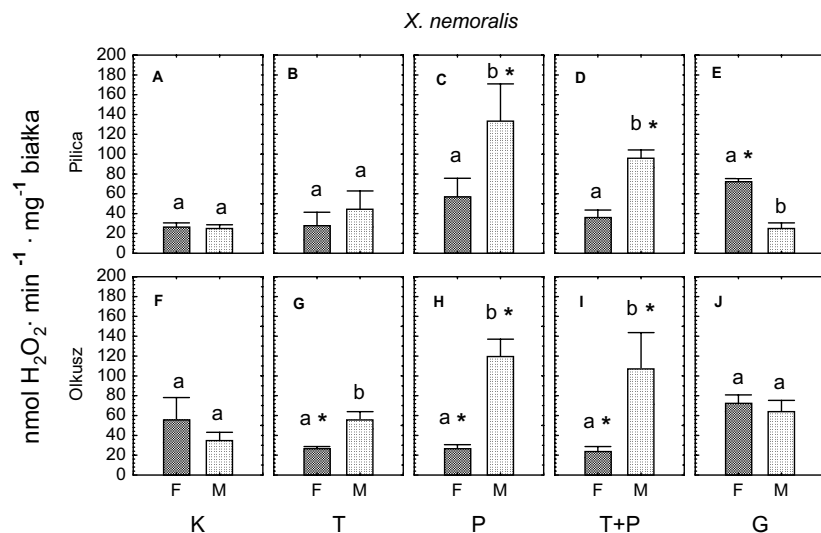
4.5.4. Głodzenie

Zarówno w przypadku głodzonych samic, jak i samców pochodzących z Olkusza zanotowano istotnie wyższą niż w kontroli aktywność GSTPx i CAT (ryc. 4.21 J; ryc. 4.24 J). Aktywność CAT u samic była dodatnio skorelowana z aktywnością SOD ($r = 0,811$), stężenie glutationu zaś było dodatnio skorelowane z aktywnością GSTPx ($r = 0,731$) (tab. A-30). Dla samców z tego stanowiska znaleziono ujemne korelacje między aktywnością SOD i CAT ($r = -0,909$)

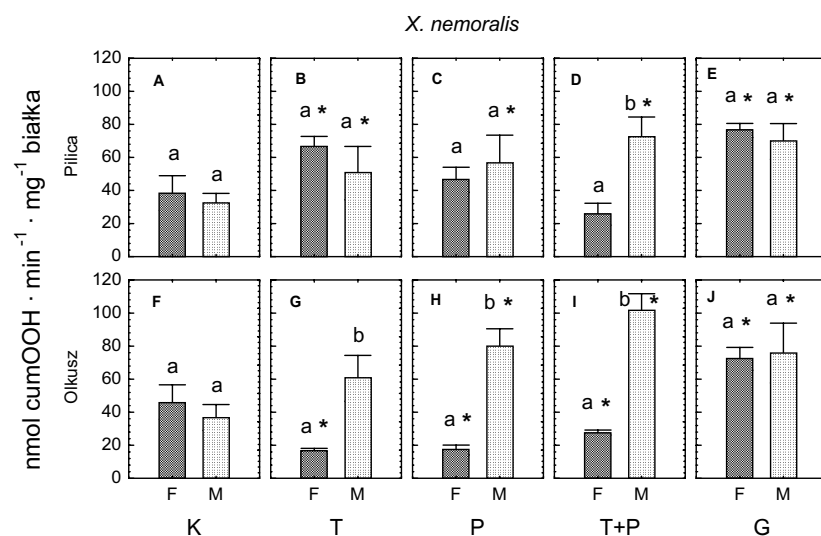
Ryc. 4.19. Stężenie glutationu (GSH + GSSG) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

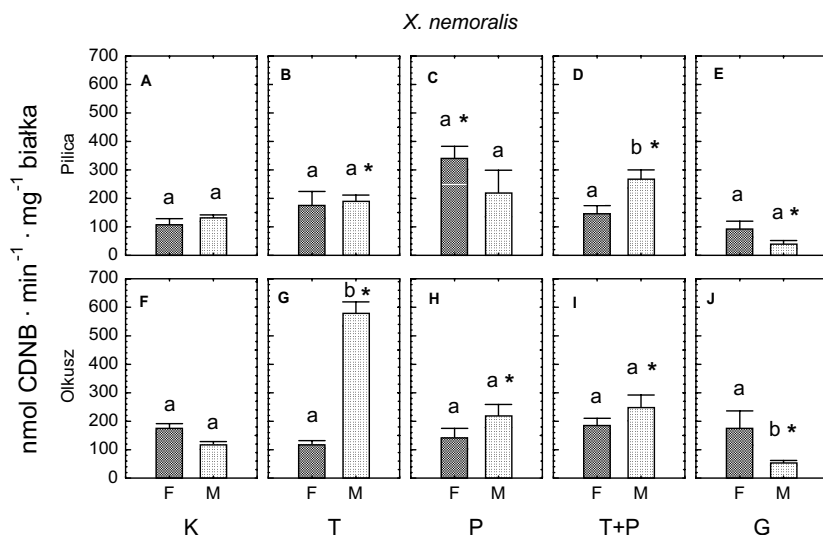


Ryc. 4.20. Aktywność peroksydazy glutationowej selenozależnej (GPOX) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

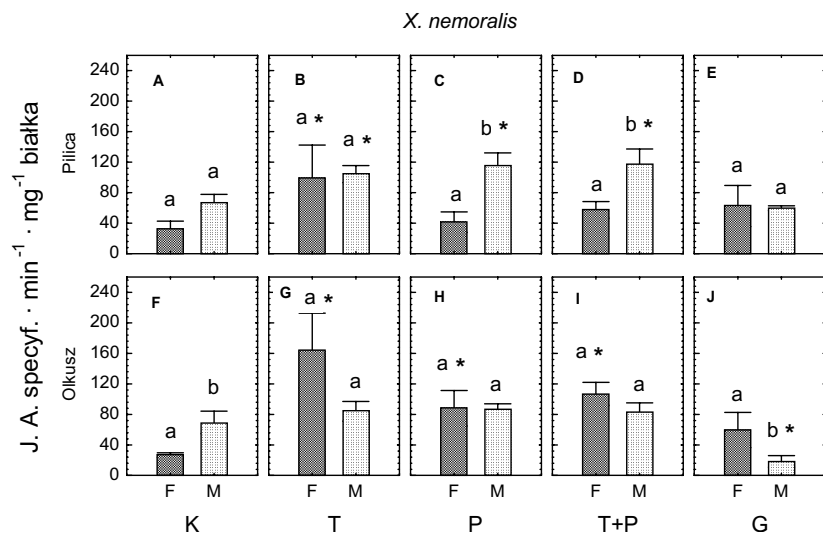


Ryc. 4.21. Aktywność peroksydazy glutationowej niezależnej od selenu (GSTPx) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

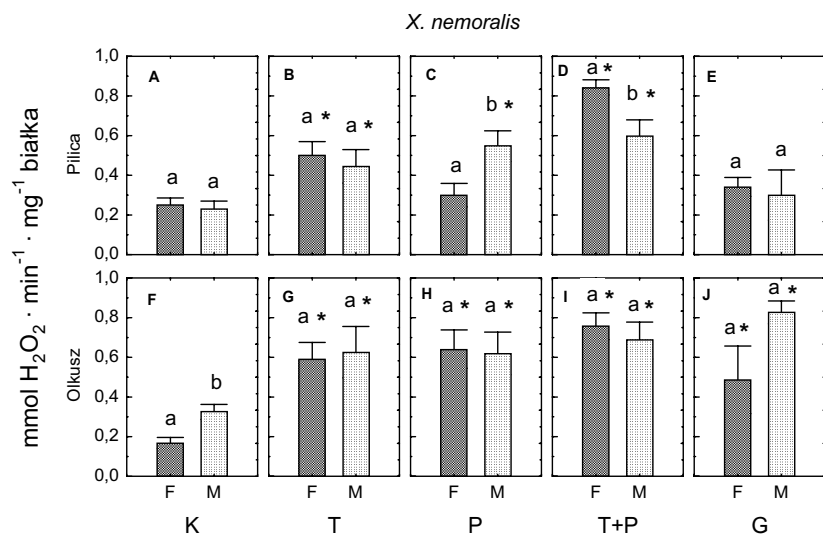




Ryc. 4.22. Aktywność *S*-transferazy glutationowej w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.23. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1



Ryc. 4.24. Aktywność katalazy (CAT) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis* w poszczególnych grupach doświadczalnych (średnie $\pm$ SD). Objaśnienia jak w ryc. 4.1

oraz między stężeniem glutationu i aktywnością GPOX ($r = -0,688$) — tab. A-32.

Głodzone samice ze stanowiska w Pilicy cechowało wyższe niż w kontroli stężenie glutationu (ryc. 14 E), a także wyższa aktywność GPOX i GSTPx (ryc. 4.20 E; ryc. 4.21 E), co znalazło odzwierciedlenie w silnych dodatnich korelacjach wymienionych parametrów (tab. A-29). W grupie głodzonych samic ze stanowiska referencyjnego liczba komórek apoptotycznych i nekrotycznych była dodatnio skorelowana z aktywnością CAT (odpowiednio: $r = 0,760$; $r = 0,635$). Podobne dodatnie korelacje znaleziono między stopniem nasilenia apoptozy i stężeniem GSH + GSSG ($r = 0,947$), aktywnością GPOX ($r = 0,971$) oraz GSTPx ($r = 0,928$) (tab. A-29).

4.6. Porównanie reakcji samic i samców na zastosowane czynniki stresogenne

Agelena labyrinthica

W wyróżnionych grupach eksperymentalnych stwierdzono zróżnicowaną wrażliwość samic i samców zależnie od zastosowanego stresora. W przypadku samców zmiany te miały charakter wielokierunkowy, obejmując zarówno wskaźniki śmierci komórkowej, białka stresu, jak i rodzaj uruchamianych reakcji antyoksydacyjnych. Samce z grup poddanych działaniu szoku termicznego (T), pestycydu (P) oraz stresowi łączonemu (T+P), w porównaniu z samicami, cechowały się istotnie większym odsetkiem komórek nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego. Zmiany te dotyczyły jednak wyłącznie pajaków pochodzących z Olkusza (ryc. 4.4 G, H, I). Głodzenie skutkowało zwiększeniem liczby komórek apoptotycznych, 13-krotnym w przypadku pajaków z Olkusza i prawie 2-krotnym w przypadku pajaków z Pilicy (ryc. 4.3 E). Głodzone samice miały średnio o 40% więcej komórek nekrotycznych (ryc. 4.4 J). W odniesieniu do pozostałych wskaźników śmierci komór-

kowej (liczba komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, aktywność Cas-3) wyższy zakres zmian wymienionych parametrów charakteryzował samce z Olkusza z grupy T+P aniżeli samice (ryc. 4.1 J, ryc. 4.2 J).

Stwierdzono, że liczba komórek Mt pozytywnych generalnie była podobna u obu płci z poszczególnych grup eksperymentalnych, za wyjątkiem samców z Olkusza, u których ekspozycja na pestycyd wywołała zwiększenie odsetka komórek Mt pozytywnych (ryc. 4.6 H). Samce z Olkusza, w porównaniu z samicami, cechowały się także wyższą aktywnością GPOX (P, P+T, G) (ryc. 4.14 H, I, J), GSTPx (P+T, G) (ryc. 4.15 I, J), GST (P, P+T) (ryc. 4.16 H, I) i CAT (P) (ryc. 4.18 H).

Reakcje samic na zastosowane czynniki stresogenne były zdecydowanie słabsze niż samców i dotyczyły głównie zmian wielkości wskaźników apoptotycznych. Odsetek komórek apoptotycznych był u samic z Olkusza z grup P i T+P istotnie wyższy niż ten odnotowany u samców z analogicznych grup (ryc. 4.3 H, I). W przypadku osobników z Pilicy podobne różnice między płciami dotyczyły pajaków z grupy T+P (ryc. 4.3 D). Łączne działanie stresu termicznego i dimetoatu wpłynęło na 2-krotne podwyższenie liczby komórek apoptotycznych w gruczołach jelita środkowego samic w porównaniu z działaniem samego pestycydu (P), podczas gdy sam szok termiczny (T) nie wywołał istotnych zmian wartości tego wskaźnika śmierci komórkowej (ryc. 4.3).

Samice ze stanowiska w Olkuszu traktowane pestycydem oraz pestycydem i szokiem termicznym zareagowały większym niż u samców z podobnych grup wzrostem liczby komórek Hsp70 pozytywnych, a stopień zmian wartości tego parametru w grupie pajaków poddanych łącznemu działaniu szoku termicznego i pestycydu może wskazywać na efekt synergistyczny obu stresorów (ryc. 4.5 C, D).

Xerolycosa nemoralis

Samce z grup P i T+P z Olkusza charakteryzowała istotnie wyższa niż samice liczba ko-

mórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami (ryc. 4.7 H, I). W grupie G liczba komórek apoptotycznych była blisko 2-krotnie wyższa u samców niż u samic, niezależnie od stanowiska (ryc. 4.9 J). Także liczba komórek nekrotycznych była wyższa u samców niż u samic w grupie G z Olkusza (ryc. 4.10 J) oraz w grupie T+P z Pilicy (ryc. 4.10 D). Samice z Olkusza, w porównaniu z samcami, cechował większy odsetek komórek apoptotycznych w grupach poddanych działaniu pojedynczych czynników stresogennych: T oraz P, odpowiednio 4- i 3-krotnie względem wartości kontrolnych (ryc. 4.9 G, H).

Wyższy procent komórek Mt pozytywnych wykazano u samic poddanych łącznemu działaniu temperatury i pestycydu (T+P), niezależnie od miejsca ich odłowu (ryc. 4.12 B, G, C,

H), jak również w przypadku głodzonych samic z Olkusza (ryc. 4.12 J). Odmienne reakcje charakteryzowały samce, u których wzrosła liczba komórek Hsp70 pozytywnych po aplikacji pestycydu oraz po łącznym działaniu pestycydu i temperatury (T+P). Stopień zmian wymienionego parametru w obu grupach doświadczalnych był podobny (ryc. 4.11 C, H, D, I).

Samce z grupy T+P w porównaniu z samicami reagowały wzrostem stężenia GSH + GSSG (ryc. 4.19 C, D), jak również wyższą aktywnością GPOX (ryc. 4.20 C, D) i GSTPx (ryc. 4.21 C, D). Aktywność CAT, niezależnie od płci, była podobna w przypadku osobników z Olkusza, podczas gdy u osobników z grupy P z Pilicy aktywność CAT była istotnie wyższa u samców niż u samic, lecz istotnie niższa u samców z grupy T+P (ryc. 4.24 C, D, H, I).

5. Dyskusja

Gatunki pajaków, które wybrano do niniejszych badań, cechuje wiele różnic w behawiorze i biologii, jak również w zdolnościach detoksykacyjnych związanych ze sposobem neutralizacji metali, a także z procesami enzymatycznej biotransformacji związków toksycznych (WILCZEK i in., 2003; 2004; 2007). Uzyskane wyniki potwierdzają odmienne gatunkowo reakcje na różnego typu czynniki stresowe. Uwidoczniły się one w odniesieniu do stwierdzonych w komórkach gruczołów jelita środkowego skutków działania stresorów w postaci zmian apoptotycznych i/lub nekrotycznych oraz rodzaju uruchamianych reakcji antyoksydacyjnych.

W badaniach uwzględniono wiele parametrów, których zmiany mogły świadczyć o skutkach wywoływanych przez zastosowane stresory, dlatego w celu lepszego udokumentowania kierunku tych zmian postanowiono na podstawie wartości średnich wyznaczyć wskaźniki względne. Wyrażono je stosunkiem średniej wartości parametru w grupie doświadczalnej do średniej wartości parametru w grupie kontrolnej (tab. 5.1—5.4).

Należy zaznaczyć, że prezentowane wskaźniki mają charakter orientacyjny, a pogrubione wartości wskazują jedynie, że stwierdzone zmiany w poszczególnych grupach doświadczalnych różnią się istotnie względem wartości uzyskanych dla grup kontrolnych, nie informują natomiast o różnicach istotnych statystycznie ze względu na płeć czy stanowisko.

5.1. Rodzaj czynnika stresowego a zmiany poziomu wskaźników śmierci komórkowej u pajaków

Ilościowa ocena komórek wykazujących cechy śmierci komórkowej w gruczołach jelita środkowego pajaków z poszczególnych grup doświadczalnych pozwoliła wykazać proapoptyczny i pronekrotyczny charakter działających czynników. Najsilniejszym z nich okazało się głodzenie, najsłabszym zaś stresor termiczny. Na tej podstawie można też stwierdzić zróżnicowaną gatunkowo wrażliwość pajaków na działanie zastosowanych stresorów ze wskazaniem na *X. nemoralis*, u którego czynniki stresogenne w większym stopniu niż u *A. labyrinthica* były przyczyną nasilenia procesów prowadzących do śmierci apoptotycznej i/lub nekrotycznej.

W przypadku pajaków trudno jest jednak, nie dysponując danymi porównawczymi, ocenić bezpośrednie skutki wzrostu wartości wskaźników śmierci komórkowej w gruczołach jelita środkowego analizowanych gatunków po krótkotrwałym działaniu stresorów o różnym charakterze. Nie poznano dotychczas, w jakim stopniu ilościowe zmiany liczby komórek apoptotycznych i nekrotycznych mogą być tolerowane przez przedstawicieli tej grupy drapieżnych bezkręgowców, a przy jakim ich poziomie następuje bezwzględne zaburzenie integralności analizo-

wanego narządu z ogólnoustrojowymi konsekwencjami włącznie. W przypadku obu gatunków największe zmiany powodował głód, odsetek bowiem komórek apoptotycznych w gruczołach jelita środkowego pajaków osiągał poziom, który maksymalnie ponad 100- i 50-krotnie przewyższał wartości kontrolne rejestrowane odpowiednio dla *A. labyrinthica* i *X. nemoralis* (tab. 5.1, tab. 5.2). Nasilenie apoptozy w organizmach eksponowanych na działanie czynników stresogennych może stanowić jeden z głównych mechanizmów regulujących usuwanie uszkodzonych komórek, skutecznie chroniąc integralność narządu podczas indukowanej toksyczności (HABEEBU i in., 1998; VAUX, 2002). Może też być wyrazem silnego stresu, w wyniku którego zaburzona zostaje homeostaza komórek danego narządu, prowadząc nawet do śmierci organizmu. Brak rejestrowanego zwiększenia śmiertelności w populacjach obu gatunków pajaków podczas 14-dniowego okresu głodu może wskazywać na wariant pierwszy.

Tabela 5.1

Względny wskaźnik zmian poziomu analizowanych parametrów (stosunek średniej wartości parametru w danej grupie doświadczalnej do średniej wartości tego parametru w grupie kontrolnej) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica*

Parametr	Płeć	Stano-wisko	Grupy doświadczalne			
			T	P	T+P	G
$\Delta\Psi_m$	F	P	5,8	2,7	3,2	1,0
		O	3,8	4,0	4,4	2,0
	M	P	5,0	2,3	2,9	0,3
		O	8,5	8,1	15,0	0,5
Cas-3	F	P	13,5	2,2	1,3	2,2
		O	1,6	2,4	8,0	5,2
	M	P	4,3	3,8	16,5	6,8
		O	23,0	36,0	140,0	22,0
Aneksyna ⁺ , PI ⁻	F	P	1,6	1,9	2,7	20,1
		O	0,9	1,4	3,5	8,5
	M	P	1,1	3,2	1,1	35,0
		O	4,5	7,0	3,0	111,0
Aneksyna ⁻ , PI ⁺	F	P	1,3	1,3	1,0	6,9
		O	2,3	1,1	3,3	22,0
	M	P	1,5	1,8	1,8	5,0
		O	5,0	4,0	20,0	10,4

Objaśnienia: P — Pilica, O — Olkusz. Wartości pogrubione wskazują na zmiany istotne statystycznie względem kontroli w poszczególnych grupach doświadczalnych ($p < 0,05$).

Tabela 5.2

Względny wskaźnik zmian poziomu analizowanych parametrów (stosunek średniej wartości parametru w grupie doświadczalnej do średniej wartości parametru w grupie kontrolnej) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis*

Parametr	Płeć	Stano-wisko	Grupy doświadczalne			
			T	P	T+P	G
$\Delta\Psi_m$	F	P	1,4	3,3	1,2	0,9
		O	11,0	9,5	13,9	8,3
	M	P	9,5	12,4	13,5	5,0
		O	11,0	20,0	25,0	7,9
Cas-3	F	P	13,6	5,2	8,2	117,4
		O	42,5	24,0	18,5	86,0
	M	P	2,1	2,2	2,0	3,7
		O	2,7	2,0	3,2	4,6
Aneksyna ⁺ , PI ⁻	F	P	2,3	7,3	10,6	47,4
		O	1,8	1,3	1,7	8,1
	M	P	2,3	1,4	3,4	38,3
		O	1,2	1,4	6,8	58,1
Aneksyna ⁻ , PI ⁺	F	P	1,3	15,4	8,8	4,8
		O	16,5	16,0	19,0	15,0
	M	P	8,4	14,2	17,1	8,5
		O	2,0	1,6	5,4	24,5

Objaśnienia: P — Pilica, O — Olkusz. Wartości pogrubione wskazują na zmiany istotne statystycznie względem kontroli w poszczególnych grupach doświadczalnych ($p < 0,05$).

Potwierdzenia proapoptotycznych konsekwencji głodu dostarczają badania prowadzone na organizmach z bardzo odległych nieraz filogenetycznie grup systematycznych. Proapoptotyczne skutki głodzenia wykazano na przykład w badaniach na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, u których przewlekły niedobór lizyny i histydy wywoływał w komórkach zmiany fenotypowo przypominające apoptozę — w postaci fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny (EISLER i in., 2004). Nasiloną apoptozę rejestrowano także w komórkach jajników chomika, gdy zwierzęta okresowo pozbawiono pokarmu (SIMON, KARIM, 2001). Badania na muszkach *D. melanogaster* wskazują, że brak pokarmu zmieniał ekspresję genu *BR-C*, zaburzając proces oogenezy i indukując zmiany apoptotyczne w komórkach jajowych (TERASHIMA, BOWNES, 2004).

Wiele informacji na temat roli składników odżywczych w regulacji śmierci apoptotycznej dostarczają badania prowadzone w warunkach *in*

vitro na kulturach komórkowych. Wykazano na przykład, że wzrost gęstości komórek w hodowli może indukować zmiany apoptotyczne wobec braku towarzyszącego uzupełniania składników odżywczych w medium hodowlanym (ARDEN, BETENBAUGH, 2004). Stymulację zmian apoptotycznych obserwowano również w sytuacji, gdy medium, w którym hodowano małe komórki linii VERO, nie suplementowano glutaminą i galaktozą (MENDONCA i in., 2002). Także w komórkach nabłonka jelita szczurów (RIE-1) pozbawionych niektórych aminokwasów (glutaminy, metioniny, cysteiny) wykazano obniżenie liczby żywych komórek, przy czym tylko w przypadku, gdy komórki nie otrzymywały glutaminy, rejestrowano nasilenie apoptozy, co potwierdza rolę tego składnika jako ważnego czynnika warunkującego prawidłowe funkcjonowanie enterocytów (PAPACONSTANTINOU i in., 1998). Badania prowadzone z wykorzystaniem komórek jajnika chomika sugerują regulacyjną funkcję procesów apoptotycznych także w odniesieniu do asparaginy (SIMON, KARIM, 2001).

Mechanizm indukcji procesów apoptotycznych w komórkach różnego typu nie jest do końca wyjaśniony. Uważa się, że niektóre aminokwasy hamują ekspresję genów prowadzących do uszkodzeń DNA (LENGWEHASATIT, DICKSON, 2002) lub wzmagają procesy skutkujące przemianami chemicznymi substancji międzykomórkowej, które nasilają separację komórek w tkance (CHOI i in., 2002). Zwiększenie liczby komórek apoptotycznych w gruczołach jelita środkowego obu gatunków pajaków może być wynikiem braku w diecie niezbędnych dla pajaków aminokwasów, co wyjaśniałoby podobny typ ogólnej reakcji pajaków w odpowiedzi na głodzenie.

W porównaniu z wartościami otrzymanymi w grupie kontrolnej stopień zmian nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego pajaków badanych po 14-dniowym okresie głodzenia był podobny u obu gatunków, lecz wyraźniej zaznaczony u osobników z Olkusza. Nie można wykluczyć, że w przypadku pajaków ze stanowiska zanieczyszczonego metalami brak pokarmu okazał się silnym dodatkowym stresorem dla komórkowego mechanizmu ochronnego. Spowodo-

wało to wzmożenie procesów prowadzących do śmierci nekrotycznej. Przyjmuje się bowiem, że w sytuacji gdy uszkodzenia komórek są zbyt duże, proces apoptotyczny nie może być w pełni realizowany i komórki giną na drodze nekrozy (CHANDRA i in., 2000). W takim ujęciu, gdy zostanie pominięty czynnik płci, oba gatunki wydają się w podobnym stopniu wrażliwe na głód. Jeżeli natomiast uwzględnimy fakt, że u *X. nemoralis* istotny wzrost liczby komórek nekrotycznych dotyczył gruczołów jelita środkowego samców, podobne zmiany zaś u *A. labyrinthica* cechowały zarówno samce, jak i samice, analizowany gatunek niesieciowy wydaje się mniej wrażliwy na wymieniony stresor (tab. 5.1—5.2).

W pracach podkreśla się, że głodzenie stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu, a skuteczność obrony antyoksydacyjnej w takich warunkach oceniana zmianami aktywności wybranych enzymów jest gatunkowo specyficzna i może zależeć od czasu depriwacji pokarmowej. Przykładowo, w gruczołach trawiennych ślimaków *Nacella concinna*, które głodzono przez 4 tygodnie, w stosunku do grup kontrolnych wykazano wzrost aktywności SOD w pierwszym tygodniu eksperymentu, w drugim tygodniu osiągała ona maksimum. Aktywność CAT i GST u głodzonych ślimaków wzrosła istotnie w drugim tygodniu doświadczenia i na takim poziomie utrzymywała się już podczas dalszego okresu głodzenia (ANSALDO i in., 2007). Podobne zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych notowano u estywujących ślimaków *Otala lactea*, u których wzrosła aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i selenozależnej peroksydazy glutationowej (HERMES-LIMA, STOREY, 1995).

Wiele informacji odnośnie do omawianego zagadnienia pochodzi z badań prowadzonych na kręgowcach wodnych. Na przykład długoterminowe pozbawienie pokarmu dorady *Sparus aurata* stymuluje aktywność SOD, aktywność CAT zaś ulega w tym czasie istotnemu obniżeniu (PASCUAL i in., 2003). Z badań MORALES i in. (2004) wynika z kolei, że przedłużające się głodzenie leszcza morskiego *Dentex dentex* wywiera u niego stymulujący wpływ na generowanie w wątrobie rodników ponadtlenkowych

i nadtlenu wodoru, z jednoczesnym wzrostem aktywności SOD, CAT i GPOX w tym narządzie w stosunku do grupy kontrolnej. Podobnie jest u dorszy *Gadus morhua*, u których podczas głodzenia aktywność CAT w wątrobie wzrasta, aktywność S-transferazy glutationowej (GST) zaś nie zmienia się istotnie względem kontroli (GUDERLEY i in., 2003).

Uwzględniając powiązania między stresem oksydacyjnym a procesami śmierci komórkowej, możliwe jest założenie, że w przypadku niedostatecznej obrony antyoksydacyjnej nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu może mieć proapoptotyczny i/lub pronekrotyczny charakter. Generalnie, w przypadku pajaków *A. labyrinthica* z obu stanowisk w grupach pajaków głodzonych liczba komórek ginących na drodze apoptozy była ujemnie skorelowana z aktywnością CAT, a pozytywnie skorelowana z liczbą komórek Hsp70 i Mt pozytywnych. Zmiany nekrotyczne pozostawały w podobnych zależnościach z wymienionymi parametrami tylko u samic z tych grup. W przypadku *X. nemoralis* z obu stanowisk odsetek komórek apoptotycznych i nekrotycznych był pozytywnie skorelowany z odsetkiem komórek Mt pozytywnych. Poziom innych wskaźników antyoksydacyjnych w relacji do wskaźników śmierci komórkowej był u tych pajaków zależny od płci, z silniej zaznaczonymi efektami głównie u samic. Może to sugerować, że wzmożenie reakcji antyoksydacyjnych charakterystycznych dla *X. nemoralis*, w porównaniu z *A. labyrinthica*, daje skuteczniejszą ochronę tym pająkom i w warunkach głodu lepiej chroni komórki analizowanego narządu przed śmiercią komórkową, zwłaszcza o charakterze nekrotycznym.

Komórkowe efekty działania innych czynników stresogennych (szok termiczny i/lub zatrucie dimetoatem) były u obu gatunków mniej nasilone od tych, które powodowało głodzenie. Niezależnie od rodzaju działającego stresora silniejsze zmiany kompensacyjne analizowanych czynników rejestrowano u *X. nemoralis* (tab. 5.1 i 5.2). Liczba komórek nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego przedstawiciela pogońcowatych wzrosła istotnie po ekspozycji na dimetoat (P) oraz stres łączony (T+P). Efekt ten

był silniejszy w porównaniu z głodzeniem czy ekspozycją tych pajaków tylko na szok termiczny. U reprezentanta Agelenidae stopień zmian nekrotycznych w grupach eksponowanych na szok termiczny i/lub pestycyd był mniejszy niż u pajaków niebudujących sieci. Nieznaczny wzrost odsetka komórek apoptotycznych u obu gatunków po działaniu szoku termicznego mógł wynikać z indukcji antyapoptotycznych białek, np. DAD1, których ekspresję potwierdzono także u pajaków w warunkach zmiany temperatury w otoczeniu (LEE i in., 2003). Według cytowanych autorów, poziom AvDAD1 mRNA u krzyżakowatych *Araneus ventricosus* w odpowiedzi zarówno na wysoką (37°C), jak i niską (4°C) temperaturę znacząco wzrastał, w porównaniu z kontrolą (25°C), osiągając najwyższy poziom po 5 godz. ekspozycji. Wyniki tych badań sugerują, że nadekspresja AvDAD1 mRNA może stanowić wyraz cytoprotekcji komórek w celu zahamowania apoptozy powodowanej przez zewnętrzny bodziec termiczny. Podobne efekty stwierdzono również w badaniach ssaczyc linii komórkowych. Ochronną rolę DAD1 przed wpływem wysokiej temperatury wykazano bowiem w komórkach linii tsBN7 chomika, które wchodziły w apoptozę w wysokiej temperaturze (39,5°C) (NAKASHIMA i in., 1993). Nie jest zatem wykluczone, że wymieniony mechanizm chroni komórki gruczołów jelita środkowego badanych gatunków pajaków przed silnymi zmianami apoptotycznymi w odpowiedzi na szok termiczny. Jednak całkowicie im nie przeciwdziałał. Wskazują na to wartości względnego wskaźnika zmian apoptotycznych w analizowanym narządzie obu gatunków pajaków (tab. 5.1 i 5.2).

Istnienie zależności między śmiercią komórkową a działaniem egzogennych czynników stresogennych, jak zmiany termiczne czy substancje chemiczne, wykazano zarówno w badaniach na bezkręgowcach, jak i kręgowcach. Ekspozycja małży *Crassostrea virginica* na wysoką dla tego gatunku temperaturę 28°C skutkowałą nasileniem apoptozy w hematocytach, podczas gdy temperatury niższe (12°C i 20°C) nie wywoływały takich efektów (CHERKASOV i in., 2007). Podobne zmiany notowano w komórkach na-

błonkowych cewek Malpighiego pluskwiaków *Panstrongylus megistus* (Hemiptera) poddanych krótko- (1 godz.) i długoterminowemu (12 godz.) działaniu szoku termicznego (40°C) (GARCIA i in., 2000). Z kolei u dżdżownic (*Eisenia fetida*) eksponowanych na subletalne stężenia malationu w glebie (0, 80, 150, 300, 600 mg związku na kg gleby; LD50 = 880 mg · kg⁻¹) metodami histologicznymi potwierdzono zmiany apoptotyczne w jądrach (ESPINOZA-NAVARRO, BUSTOS-OBREGON, 2004). Proapoptotyczny efekt wykazano także w komórkach tkanki nerwowej kijanek i osobników dorosłych ropuchy *Bufo arenarum*, traktowanych cypermetryną, o czym świadczyła masowa fragmentacja jąder w komórkach nerwowych, szczególnie u osobników młodych (CASCO i in., 2006).

Szczegółowych informacji na temat śmierci komórkowej w powiązaniu z określonymi czynnikami egzogennymi dostarczają badania prowadzone z użyciem linii komórkowych, w których wykazano zależność między stresem oksydacyjnym a ekspozycją komórek na czynniki fizyczne i chemiczne. Eksperymenty przeprowadzone w warunkach *in vitro*, m.in. na komórkach linii nowotworowych białaczki promielocytowej HL-60 (HE, FOX, 1997; GORMAN i in., 1999) czy chłoniaka U937 kręgowców (SAMALI, COTTER, 1996), ujawniły zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu i towarzyszące nasilenie zmian apoptotycznych w odpowiedzi na wysoką temperaturę. Z kolei badania komórek linii HL-60 i BIAB poddanych działaniu rotenonu (TADA-OIKAWA i in., 2003) czy mysich komórek chłoniaka EL4 eksponowanych na paraoxon (SALEH i in., 2003) wskazują na prooksydacyjną i proapoptotyczną funkcję pestycydów. Mechanizm działania czynników chemicznych prawdopodobnie polega na indukcji nadtlenu wodoru, który powoduje istotne zmiany transmembranowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$). Cytotoksyczność wymienionych związków może wynikać z blokowania przepływu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, co w ostateczności sprzyjało formowaniu się rodników ponadtlenukowych, które spontanicznie lub w obecności Mn-SOD przechodziły w H₂O₂. Gromadzący się produkt tej reakcji prowadzi do

otwarcia megakanalów i uruchomienia kolejnych etapów apoptozy, w tym aktywacji kaspaz (MIZUTANI i in., 2002; TADA-OIKAWA i in., 2003). Nie jest także wykluczone, że stymulacja depolaryzacji mitochondriów może wynikać z lipofilnej natury związków fosforoorganicznych, która ułatwia interakcje z błonami komórkowymi, prowadząc do zmian ich właściwości fizykochemicznych, w tym zwiększenia przepuszczalności, sprzyjając przemieszczaniu się protein z organelli do cytozolu lub poza komórkę (VIDEIRA i in., 2001). Badania prowadzone w warunkach *in vitro* znajdują potwierdzenie także w badaniach *in vivo*. W celomocytach sikwiaków *Themiste petricola* (Sipuncula) nadtlenuk wodoru w stężeniu 100 mM indukuje zmiany morfologiczne i biochemiczne w postaci kondensacji chromatyny, segmentacji jąder, zmniejszenia objętości komórek i formowania ciał apoptotycznych. W komórkach tych następuje także ekspozycja fosfatydyloseryny na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej, jak również obniżenie wielkości potencjału mitochondrialnego (BLANCO i in., 2005).

W niniejszych badaniach liczba komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego obu gatunków pająków eksponowanych na dimetoat (P) lub szok termiczny (T) wzrosła istotnie względem grupy kontrolnej, podczas gdy aktywność proteazy kaspazopodobnej w podobnych warunkach generalnie nie zmieniła się. Wskazuje to na znaczący wpływ wymienionych stresorów głównie w odniesieniu do zmian wielkości potencjału mitochondrialnego (tab. 5.1—5.2). W przypadku *X. nemoralis* eksponowanych na dimetoat tylko u osobników z Olkusza wymienione wskaźniki były ze sobą skorelowane, przy czym każdy z tych parametrów został także dodatkowo skorelowany ze stopniem nasilenia śmierci nekrotycznej w komórkach analizowanego narządu. Ekspozycja na szok termiczny i stres łączony ujawniła takie zależności również w odniesieniu do zmian odsetka komórek apoptotycznych. W przypadku *A. labyrinthica* dodatnie korelacje między liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami i aktywnością proteazy kaspazopodobnej wykazano we wszystkich grupach

eksponowanych na szok termiczny i/lub pestycyd. Oba wymienione parametry były dodatnio skorelowane z ilościowymi zmianami komórek apoptotycznych i/lub nekrotycznych, zależnie od rodzaju stresora. Stwierdzone wzajemne powiązania między wskaźnikami śmierci komórkowej w gruczołach jelita środkowego pajaków sugerują, że u obu gatunków analizowane parametry można zastosować jako biomarkery stresu komórkowego skutków oddziaływań czynników naturalnych i antropogennych przekraczających zakres tolerancji tych pajaków. Brak jednak jednoznacznych zależności między poziomem wskaźników śmierci komórkowej a rodzajem oddziałujących stresorów nie pozwala precyzyjnie różnicować przyczyn zaistniałych zmian, a jedynie informuje o istniejącym stresie.

Ilościowe zmiany wartości analizowanych wskaźników śmierci komórkowej u *X. nemoralis* skłaniają do przypuszczeń, że pająki te w naturalnym środowisku bytowania w konfrontacji z podobnymi czynnikami są bardziej wrażliwe na stres niż *A. labyrinthica*. Uwzględniając jednak fakt, że warunki laboratoryjnej ekspozycji zwierząt na działające stresory po części uniemożliwiały naturalne reakcje behawioralne tych drapieżników wobec różnych jakościowo stresorów, można założyć, że w środowisku ich bytowania odpowiedzi komórkowe na zastosowane czynniki w przypadku *X. nemoralis* mogą być słabsze. Przyjmuje się, że osobniki tego gatunku ze względu na aktywny tryb życia w warunkach naturalnych będą wybierać miejsca bardziej sprzyjające pod względem chemicznym i termicznym. Wydaje się zatem, że większa wytrzymałość na głodzenie, pomimo wykazanej w warunkach laboratoryjnych słabszej tolerancji innych czynników, daje tym pająkom większe szanse przeżycia w sytuacji nagle pojawiających się dodatkowych czynników stresogennych. Potwierdzeniem owych przypuszczeń są komplementarne badania autorki, w których porównywano wpływ szoku termicznego w zakresach górnych temperatur krytycznych na aktywność acetylocholinesterazy (AChE) u pajaków z rodziny Agelenidae (42°C) i Lycosidae (45°C), które wskazują, że przedstawiciele pogońcowatych *P. lugubris*, w odróżnieniu od przedstawi-

ciela pajaków tunelowych *A. labyrinthica*, są mniej wrażliwe na działanie wymienionego stresora. Świadczyła o tym niezmienną aktywność AChE w trakcie trwania eksperymentu, a także jeszcze po godzinie od jego zakończenia. W przypadku *A. labyrinthica* aktywność AChE była istotnie niższa niż w kontroli zarówno po godzinie, jak i po upływie doby od zastosowania szoku termicznego (WILCZEK, dane niepublikowane). Może to sugerować, że działanie wysokiej temperatury w warunkach naturalnych też nie zmniejszy w sposób natychmiastowy zdolności lokomotorycznych pogońcowatych *P. lugubris* (brak zmian w aktywności acetylocholinesterazy). Słabe efekty inhibicyjne w odniesieniu do AChE wykazano ponadto w przypadku wymienionego przedstawiciela Lycosidae w odpowiedzi na działanie pestycydu fosforoorganicznego. Analiza aktywności AChE u *P. lugubris* po topikalnym zastosowaniu dimetoatu w dawkach subletalnych wskazuje, że jednorazowa ekspozycja na pestycyd nie upośledza zdolności lokomotorycznych pajaków (BAB- CZYŃSKA i in., 2006). Można zatem założyć, że w sytuacji nagle pojawiających się dodatkowych czynników stresogennych przedstawiciele rodziny Lycosidae są w stanie dłużej niż Agelenidae tolerować niekorzystne warunki życia, a przede wszystkim aktywnie chronić się przed działającymi czynnikami.

5.2. Antyoksydacyjna obrona u pajaków w odpowiedzi na czynniki stresowe

Niezależnie od charakteru działających czynników stresogennych pająki *X. nemoralis* uruchamiały enzymatyczne reakcje neutralizujące reaktywne formy tlenu, jak też nasilały syntezę białek stresu. Podstawę antyoksydacyjnych odpowiedzi komórkowych u pajaków sieciowych *A. labyrinthica* stanowiły natomiast głównie Hsp70 i glutation, których synteza wzrosła po ekspozycji na wszystkie zastosowane czynniki

stresogenne, przy słabo zaznaczonych enzymatycznych reakcjach antyoksydacyjnych.

Szczególnie wyraźnie u obu gatunków uwidoczniły się różnice dotyczące zmian odsetka komórek Hsp70 pozytywnych w odpowiedzi na stres. Mimo że w warunkach kontrolnych liczba tych komórek w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica* była blisko 5-krotnie niższa niż u *X. nemoralis*, to zakres zmian wartości tego parametru w odpowiedzi na zastosowane czynniki był wyższy u tego pierwszego.

Produkcja Hsp70 najsilniej była stymulowana w gruczołach jelita środkowego u głodzonych samców pajaków *A. labyrinthica*, podczas gdy w pozostałych grupach doświadczalnych utrzymywała się na poziomie od ponad 2-krotnie (grupa P) do blisko 17-krotnie (grupa T+P) wyższym niż w grupie kontrolnej (tab. 5.3). Porównując stopień zmian tego parametru u *X. nemoralis*, odpowiedź była zróżnicowana w zależności od płci. U samic podwyższenie odsetka komórek Hsp70 pozytywnych zarejestrowano tylko w grupach poddanych szokowi termicznemu. U samców podobna tendencja wystąpiła we wszystkich grupach doświadczalnych (tab. 5.4).

Dotychczasowe badania podkreślają znaczną konserwatywność genów z rodziny *hsp70*, wskazując, że w odpowiedzi na stres mogą one ulegać ekspresji w dwojaki sposób. Pierwszy z nich, związany z grupą genów *hsp70* odpowiedzialnych za ekspresję białek szoku termicznego (Hsp70), zakłada bardzo niski podstawowy poziom wymienionych białek, gdy na organizm nie działają dodatkowe czynniki, i silną stymulację ich syntezy w warunkach stresu. W przypadku drugiej grupy genów *hsc70*, kodujących białka określane mianem Hsc70 podobnych białek stresu (*heat shock cognate 70*; Hsc70), ich ekspresja jest stale utrzymywana w komórce na wyższym poziomie i zmienia się w niewielkim stopniu w odpowiedzi na stres, na przykład niską lub wysoką temperaturę (KARLIN, BROCCIERI, 1998; KREGEL, 2002). W świetle niniejszych badań, zakres zmian poziomu białek Hsp70 notowany w przypadku *A. labyrinthica* w kontroli, jak i w odpowiedzi na stres o różnym charakterze może być przykładem pierwszego z wymie-

Tabela 5.3

Względny wskaźnik zmian poziomu analizowanych parametrów (stosunek średniej wartości parametru w grupie doświadczalnej do średniej wartości parametru w grupie kontrolnej) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *A. labyrinthica*

Parametr	Płeć	Stanowisko	Grupy doświadczalne			
			T	P	T+P	G
Mt	F	P	14,0	7,2	13,0	25,2
		O	1,3	1,4	0,8	1,2
	M	P	33,0	33,0	67,0	48,6
		O	1,3	16,0	3,4	6,2
Hsp70	F	P	3,1	2,2	2,6	2,9
		O	5,3	5,2	13,1	14,0
	M	P	6,9	8,5	16,6	44,0
		O	9,8	2,3	3,1	18,0
GSH + GSSG	F	P	4,5	1,7	3,1	1,2
		O	4,9	4,0	3,7	3,2
	M	P	1,4	1,9	1,9	1,6
		O	1,6	1,5	1,8	2,0
GPOX	F	P	0,9	0,7	0,5	0,6
		O	1,0	1,6	1,6	1,1
	M	P	1,3	1,3	1,5	0,5
		O	0,8	3,1	4,7	1,9
GSTPx	F	P	1,1	0,9	1,3	0,9
		O	1,1	0,7	0,8	0,6
	M	P	1,4	1,6	2,0	2,3
		O	1,3	1,0	2,8	1,3
GST	F	P	0,9	1,0	0,7	1,5
		O	1,3	1,5	1,6	1,5
	M	P	1,0	1,2	1,5	0,4
		O	2,5	2,4	6,5	0,8
SOD	F	P	1,1	1,4	1,3	1,4
		O	0,9	0,79	0,9	0,7
	M	P	0,6	1,0	0,7	0,8
		O	0,8	0,9	0,7	0,6
CAT	F	P	1,9	1,1	1,0	0,4
		O	0,7	0,9	0,4	0,4
	M	P	1,5	1,4	1,8	0,5
		O	0,8	1,5	0,7	0,2

Objaśnienia: P — Pilica, O — Olkusz. Wartości pogrubione wskazują na zmiany istotne statystycznie względem kontroli w poszczególnych grupach doświadczalnych ($p < 0,05$).

nionych mechanizmów, podczas gdy drugi jest charakterystyczny dla *X. nemoralis*. Badania prowadzone na roztoczach *Tetranychus urticae* eksponowanych na niską (4°C) lub wysoką temperaturę (38°C) wskazują, że niezależnie od zastosowanego stresora poziom transkryptów

Tabela 5.4

Względny wskaźnik zmian poziomu analizowanych parametrów (stosunek średniej wartości parametru w grupie doświadczalnej do średniej wartości parametru w grupie kontrolnej) w gruczołach jelita środkowego samic (F) i samców (M) *X. nemoralis*

Parametr	Płeć	Stano- wisko	Grupy doświadczalne			
			T	P	T+P	G
Mt	F	P	1,2	5,5	4,1	2,3
		O	3,0	3,5	3,8	5,6
	M	P	0,7	4,6	1,6	2,3
		O	1,9	2,2	1,0	0,8
Hsp70	F	P	1,3	0,9	1,1	0,8
		O	4,0	0,7	0,7	0,6
	M	P	3,8	3,8	11,2	3,9
		O	6,8	4,8	5,3	0,7
GSH + GSSG	F	P	1,5	2,1	2,8	7,9
		O	2,4	1,0	1,0	2,2
	M	P	1,8	3,1	3,7	0,9
		O	1,2	1,4	1,5	0,9
GPOX	F	P	1,0	2,1	1,4	2,6
		O	0,5	0,5	0,4	1,3
	M	P	1,8	5,5	3,9	1,0
		O	1,6	3,5	3,1	1,9
GSTPx	F	P	1,7	1,2	0,7	2,0
		O	0,3	0,4	0,6	1,6
	M	P	1,5	1,8	2,3	2,2
		O	1,7	2,2	2,8	2,1
GST	F	P	1,7	3,2	1,4	0,9
		O	0,7	0,8	1,1	1,2
	M	P	1,5	1,7	2,1	0,3
		O	5,0	1,9	2,1	0,5
SOD	F	P	3,1	1,3	1,8	1,9
		O	6,3	3,4	4,1	2,2
	M	P	1,6	1,7	1,7	0,9
		O	1,2	1,2	1,1	0,3
CAT	F	P	2,0	1,2	3,4	1,4
		O	3,6	4,0	4,7	2,8
	M	P	2,0	2,5	2,7	1,4
		O	1,9	1,9	2,1	1,6

Objaśnienia: P — Pilica, O — Olkusz. Wartości pogrubione wskazują na zmiany istotne statystycznie względem kontroli w poszczególnych grupach doświadczalnych ($p < 0,05$).

hsc70 był zbliżony do wartości kontrolnych (SHIM i in., 2006). Podobne odpowiedzi na szok termiczny rejestrowano w ciele tłuszczowym i w tkance nerwowej szarańczy *Locusta migratoria* (45°C przez 3 godz.) (QIN i in., 2003) oraz u chrząszcza *Tribolium castaneum* (40°C przez

1 godz.), lecz dotyczyło to tylko starszych larw, poczwerek i dorosłych (MAHROOF i in., 2003).

Ekspresja białek szoku termicznego w odpowiedzi na stres głodzenia jest specyficzna gatunkowo i zależy od trybu życia zwierzęcia. Wykazano na przykład, że głodzenie nie zmieniało istotnie, w porównaniu z wartościami kontrolnymi, poziomu białek Hsp70 u *Julus scandinavicus* (Diplopoda) (ZANGER, KÖHLER, 1996). Z kolei w wątrobie głodzonych myszy ekspresja białek chaperonowych była niska, a w limfocytach śledziony nie uległa zmianie (DHAHBI i in., 1997). Powrót do normalnego żerowania powodował u myszy szybką ekspresję genów *hsc70* (DHAHBI i in., 2002). Inaczej było u samic roztocza *Tetranychus urticae*, u których poziom produktów genu *hsc70* nie zmieniał się istotnie nawet po 6 godz. normalnego żywienia (SHIM i in., 2006). Wykazano także, że nawet chwilowy brak pokarmu może powodować aktywację białek regulowanych glukozą 78 (grp78) (MOTE i in., 1998), które są homologiczne do Hsp70 i mogą reagować z tymi samymi przeciwciałami (ZANGER i in., 1996). Wiązanie się przeciwciał anty-Hsp70 z białkami grp78 może utrudniać generalną ocenę białek Hsp70 w okresie głodu. Znaczący wzrost odsetka komórek Hsp70 pozytywnych, który cechował pająki, zwłaszcza głodzone samce *A. labyrinthica* ze stanowiska w Pilicy, może odzwierciedlać taką właśnie przyczynę rejestrowanych zmian, tym niemniej sugeruje, że pająki te są znacznie bardziej niż pozostałe osobniki wrażliwe na niedobory składników odżywczych i energetycznych. Przypuszczenia te znajdują potwierdzenie także w silniejszych zmianach nekrotycznych i apoptotycznych w analizowanym narządzie samców ze stanowiska w Pilicy niż samców ze stanowiska w Olkuszu.

Ekspresja białek stresu może się nasilać podczas stresu oksydacyjnego, wywołanego działaniem różnych czynników. Białka te uważa się za ważny element obrony antyoksydacyjnej w wielu grupach zwierząt (SAMALI, ORRENIUS, 1998; CREAGH i in., 2000; SREEDHAR, CSERMELY, 2004). Na przykład badania prowadzone na małżach *Donax variabilis* eksponowanych na stresory o różnym charakterze (siarczek wodoru,

hipoksja, hiperoksja) wskazują, że tylko w warunkach hiperoksji poziom Hsp70 wzrósł istotnie względem kontroli, podczas gdy pozostałe stresory nie wywoływały ilościowych zmian w białkach szoku termicznego (JOYNER-MATOS i in., 2006). Dodatnie korelacje między produkcją aktywnych form tlenu i indukcją białek Hsp znaleziono także w komórkach mięśnia sercowego szczurów (SREEDHAR i in., 2002), w monocytach kręgowców (HONG i in., 1998), czy w ludzkich liniach komórkowych (Caco-2) pochodzących z nabłonka jelita (GEBHARDT i in., 1999). Produkcja białek Hsp70 w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica* w grupach poddanych działaniu wysokiej temperatury i/lub pestycydu ma zatem charakter cytoprotekcyjny, czego wyraźnym przejawem są stosunkowo niewielkie, w odniesieniu do wartości kontrolnych, ilościowe zmiany apoptotyczne i nekrotyczne w analizowanym narządzie. W przypadku *A. labyrinthica* z większości grup doświadczalnych stwierdzono również dodatnie korelacje między liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego. Jak wynika z badań POLLA i in. (1996), nasilenie produkcji białek Hsp72 w komórkach ssaków eksponowanych na szok termiczny przeciwdziało niskiemu $\Delta\Psi_m$ przez hamowanie powstawania w mitochondriach H_2O_2 . Nasilona ekspresja białek szoku termicznego może hamować apoptozę także przez blokowanie wpływu białek mitochondrialnych do cytoplazmy (SAMALI, ORRENIUS, 1998). Potwierdzono też hamującą rolę Hsp70 w dalszych etapach procesu apoptozy, która polegała na przeciwdziałaniu aktywacji kaspaz i zapobieganiu zmianom jądrowym (CREAGH i in., 2000; PARCELLIER i in., 2003). W przypadku pochodzących z obu stanowisk samic i samców sieciowego *A. labyrinthica* ekspozycja na łączony stres (T+P) oraz szok termiczny (T) i dimetoat (P), działające oddzielnie, powodowała zwiększenie liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego bez względu na płeć osobników i miejsce ich odłowu. Jednak zmiany aktywności proteazy kaspazopodobnej nie były tak jednoznaczne, gdyż stymulacja dotyczyła tylko grup eksponowanych na stres

łączony (T+P). Mogło to oznaczać, że rejestrowano wczesne etapy apoptozy, kiedy zmiany ograniczały się głównie do mitochondrium. Związek między wysokim odsetkiem komórek apoptotycznych i nekrotycznych w analizowanym narządzie głodzonych osobników *A. labyrinthica* z towarzyszącymi słabymi zmianami zarówno liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, jak i aktywności proteazy kaspazopodobnej, jest niejasny. Podobnie jak wątpliwa jest w przypadku tej grupy doświadczalnej (G) cytoprotekcyjna funkcja analizowanych białek szoku termicznego, pomimo bowiem wysokiego odsetka komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pająka sieciowego rejestrowano nasilenie względem kontroli zmian apoptotycznych i nekrotycznych. Podobnie słabe zależności między ilościowymi zmianami komórek Hsp70 pozytywnych a ilościowymi zmianami komórek apoptotycznych i/lub nekrotycznych dotyczyły *X. nemoralis* w odniesieniu do większości działających stresorów. W przypadku samic i samców pogońcowatych z grup eksponowanych na szok termiczny zanotowano dodatnie korelacje między wymienionymi parametrami. Z kolei tylko u samców głodzenie, dimetoat, łączne działanie temperatury i pestycydu nasiliły produkcję Hsp70 i zmiany apoptotyczne. Zależności między liczbą komórek Hsp70 pozytywnych i zmianami nekrotycznymi były w przypadku obu gatunków słabo zaznaczone.

Stymulacji ekspresji białek Hsp może towarzyszyć wzrost aktywności innych wskaźników antyoksydacyjnych. Badania prowadzone na ślimakach mułowych *Ilyanassa obsoleta* wskazują, że stresory naturalne i antropogeniczne, takie jak szok termiczny, kadm czy pestycydy były przyczyną silnego stresu oksydacyjnego, co przejawiało się stymulacją produkcji białek Hsp70, Hsp60, GSH oraz wzrostem aktywności SOD i innych enzymów, na przykład związanych z cytochromem P450 (DOWNS i in., 2001). W niniejszych badaniach zależności między poziomem białek stresu a innymi parametrami antyoksydacyjnymi nie zaznaczyły się w sposób istotny, tylko bowiem w przypadku *A. labyrinthica* z grupy poddanej działaniu szok termicz-

nego (T) znaleziono dodatnie korelacje między liczbą komórek Hsp70 pozytywnych a stężeniem glutationu całkowitego. Z kolei w gruczołach jelita środkowego samic *X. nemoralis* eksponowanych na szok termiczny (T), jak również samców tego gatunku, poddanych łącznie działaniu temperatury i pestycydu (T+G) wzrost odsetka komórek Hsp70 pozytywnych był skorelowany dodatnio z poziomem GSH + GSSG i CAT.

Jeżeli założymy, że zastosowane czynniki stresogenne sprzyjały generowaniu reaktywnych form tlenu, to na podstawie stopnia zmian analizowanych parametrów antyoksydacyjnych można wnioskować o ich potencjale ochronnym w stosunku do komórek gruczołów jelita środkowego analizowanych gatunków pajaków. Z przeprowadzonych badań wynika, że rodzaj uruchamianych reakcji obronnych był gatunkowo specyficzny. W odpowiedzi na stres wywołany działaniem czynników egzogennych w gruczołach jelita środkowego obu gatunków pajaków wzrastało stężenie glutationu całkowitego. Poziom tego tripeptydu notowany w analizowanym narzędzie zwierząt kontrolnych był, niezależnie od stanowiska i płci, około dwa razy wyższy u *X. nemoralis* niż u *A. labyrinthica*. Przyczyną zaistniałych różnic może być lepsze wykorzystanie detoksykacyjnej funkcji glutationu przez *X. nemoralis*, odnoszące się zarówno do metali, jak i związków organicznych. Bezpośredni udział zredukowanego glutationu w wiązaniu jonów metali odbywa się dzięki obecności grupy tiolowej, która z wymienionymi elementami tworzy kompleksy (VIARENGO i in., 1997; SIES, 1999). Reszta sulfhydrylowa cysteiny, nadająca cząsteczce GSH wysoki potencjał redukcyjny, odpowiada też za możliwość udziału glutationu w enzymatycznych reakcjach antyoksydacyjnych (JI, LEEUWENBURGH, 1996). Ponieważ w niniejszych badaniach nie stwierdzono wyraźnych międzygatunkowych różnic w kontrolnym poziomie aktywności GPOX i GSTPx, można przyjąć, że *X. nemoralis* skuteczniej niż *A. labyrinthica* wykorzystuje glutation w bezpośrednim wiązaniu metali. Uzasadnia to fakt blisko 2-krotnie wyższego stężenia Cd, Cu, Zn w gruczołach jelita środkowego pogońcowatych

X. nemoralis niż *A. labyrinthica* z Pilicy oraz Pb niezależnie od stanowiska (WILCZEK i in., 2007). Większe predyspozycje pogońcowatych do kumulowania metali w gruczołach jelita środkowego mogły zatem sprzyjać utrzymywaniu glutationu na wyższym poziomie celem wykorzystania go w bezpośrednim unieczynnianiu metali.

Aktywność GST — ważnego enzymu II fazy detoksykacji, zużywającego glutation w reakcjach sprzęgania ksenobiotyków, w analizowanym narzędzie kontrolnych pajaków niesieciovych była średnio 2-krotnie wyższa niż pajaków tunelowych (*A. labyrinthica*). Otrzymane rezultaty wskazują na to, że w przypadku *X. nemoralis* reakcje sprzęgania stanowią ważny element biotransformacji ksenobiotyków. Wydaje się zatem, że u przedstawiciela rodziny Lycosidae udział GSH w reakcjach enzymatycznych katalizowanych przez peroksydazy glutationowe może być mniejszy. Potwierdzają to także wyniki wcześniejszych badań u innego przedstawiciela rodziny Lycosidae, *P. lugubris*, z terenów silnie zanieczyszczonych, u którego stężenie glutationu oraz aktywność GPOX i GSTPx były kilkukrotnie niższe niż u *A. labyrinthica* (WILCZEK i in., 2004). Podobnie w badaniach na *P. palustris* (Lycosidae) wykazano, że u osobników, które miały wysokie stężenie Zn, Pb i Cd, w ciele też była wysoka aktywność katalazy (WILCZEK, MIGULA, 1996). Rezultaty niniejszej pracy również pokazują, że w odpowiedzi na zastosowane czynniki stresogenne znamienne dla *X. nemoralis* było nasilenie aktywności CAT. Aktywność wymienionego enzymu dodatkowo korelowała z aktywnością SOD w grupach poddanych działaniu szoku termicznego i/lub pestycydu. Z kolei aktywność peroksydaz glutationowych u *X. nemoralis* utrzymywała się na poziomie bliskim kontrolnemu lub w wymienionych grupach obniżała się istotnie, zwłaszcza u samic.

Katalaza jest enzymem, który reaguje bardzo szybko (k_m rzędu $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (BARTOSZ, 1995), wykazując dwoisty mechanizm katalityczny: katalazowy, uczestnicząc w reakcji dysproporcjacji nadtlenu wodoru, oraz peroksydazowy, utleniając takie substancje jak: metanol, etanol czy chinony (HOSETTI, FROST, 1993). Pomimo że ka-

talaza i peroksydazy glutationowe mogą współdziałać ze sobą w ochronie komórki przed reaktywnymi formami tlenu, to zwykle o tym, który z tych enzymów jest bardziej aktywny w neutralizacji nadtlenu wodoru, decyduje stężenie tego substratu w komórce. Niższe stężenia H_2O_2 sprzyjają uruchomieniu peroksydazy glutationowej, a wyższe aktywizują katalazę. Przyczyną tych różnic jest prawdopodobnie wysoki koszt energetyczny cyklu, w którym peroksydaza glutationowa kieruje atak nadtlenu wodoru na glutation, gdyż zużywa NADPH. Nie jest więc wykluczone, że w przypadku *X. nemoralis* to, że skuteczniejszą obronę antyoksydacyjną mogła zabezpieczać CAT, mogło mieć także podłoże oszczędzania energii. Enzymatyczne odpowiedzi antyoksydacyjne *A. labyrinthica* były słabsze, a wzajemne relacje między parametrami antyoksydacyjnymi dotyczyły głównie wskaźników związanych z metabolizmem glutationu. Wyniki te korespondują z rezultatami wcześniejszych badań, w których wykazano, że samice *A. labyrinthica* z terenu silnie zanieczyszczonego charakteryzowała wysoka aktywność peroksydazy zarówno selenozależnej (GPOX), jak i niezależnej od selenu (GSTPx) oraz wysokie stężenie glutationu (GSH+GSSG) (WILCZEK i in., 2004). Wydaje się więc, że podczas obrony antyoksydacyjnej przedstawiciele Agelenidae w większym stopniu niż Lycosidae wykorzystują enzymy związane z glutationem, a zatem strategię antyoksydacyjną pajaków w warunkach ekspozycji na działanie różnorodnych stresorów są gatunkowo specyficzne, co pokazuje, że nie można danych uzyskanych dla jednego gatunku bezpośrednio ekstrapolować na inny (WILCZEK i in., 2003; 2004).

W literaturze przedmiotu można znaleźć przykłady, które podkreślają, że zmiany wielkości parametrów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na czynniki stresogenne są gatunkowo specyficzne, a rodzaj uruchamianych reakcji zależy od charakteru działających czynników (naturalne/antropogeniczne, biotyczne/abiotyczne), czasu ekspozycji oraz ich natężenia. W badaniach tych często się podkreśla, że czułym biomarkerem odpowiadającym na działanie związków organicznych i metali ciężkich są zmiany stężenia

zredukowanego glutationu. Na przykład w eksperymentach prowadzonych na *Carassius auratus* wykazano, że 40-dniowa ekspozycja tych ryb na 2,4-dichlorofenol ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), składnik wielu herbicydów, doprowadza do szybkiej redukcji stężenia GSH w wątrobie, gdy tymczasem stężenie utlenionej formy tripeptydu (GSSG) oraz reduktazy glutationowej (GR) nie zmieniały się istotnie podczas trwania tego eksperymentu (ZHANG i in., 2005). Z kolei efektem działania subletalnych stężeń insektycydu fosforoorganicznego (RPR-II; $0,017 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; 1/10 LC50), w których przetrzymywano tilapię mozambijską *Oreochromis mossambicus* przez 3, 7, 15 i 30 dni było obniżenie stężenia GSH w mózgu, skrzelach i wątrobie oraz wzmożenie procesu peroksydacji lipidów, z równoczesnym nasileniem aktywności GST w tych narządach jako odzwierciedlenie możliwości protekcyjnych w odpowiedzi na stres chemiczny. Po 7 dniach od zaprzestania działania czynnika stresogenego stężenie glutationu w skrzelach i mózgu wracało do wartości kontrolnych, a w wątrobie utrzymywało się na poziomie średnio o 21% niższym w porównaniu z kontrolnym (RAO, 2006). Z kolei kielbie *Mugil* sp. odłowione z rzeki zanieczyszczonej węglowodorami aromatycznymi ($44 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) i cyklicznymi bifenyłami ($2,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) przejawiały wzrost syntezy GSH, a także aktywności enzymów związanych z metabolizmem tego tripeptydu (RODRIGUEZ-ARIZA i in., 1993).

Skutki działania związków toksycznych, zależnie od ich chemicznych właściwości, nawet u tego samego organizmu mogą być odmienne. Eksponując małże *Perna perna* na ołów (1 ppm) i/lub parakwat (10 ppm) przez 48 godz., wykazano, że metal nie wywołał istotnych zmian w aktywności CAT, GST i GR, gdy tymczasem związek organiczny wzmacniał aktywność GR i obniżał aktywność GST (DAFRE i in., 2004). Z kolei długotrwała ekspozycja węgorza *Anguilla anguilla* na wysokie stężenia herbicydu (molinian, 5/4 LC50: $41,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) wykazała, że długość życia ryb w takich warunkach była pozytywnie skorelowana ze stężeniem glutationu w wątrobie oraz z aktywnością GR w wątrobie i w mięśniach (PENA-LLOPIS i in., 2001). Badania

te pokazują, że zwierzęta, u których indukowana jest aktywność reduktazy glutationowej, wzrasta stężenie GSH i utrzymuje się właściwy stosunek GSH do GSSG w wątrobie, mogą lepiej przeżywać warunki stresu oksydacyjnego niż te osobniki, u których zaburzona zostaje homeostaza wymienionego tripeptydu. W niniejszych badaniach stopień zmian poziomu GSH + GSSG w stosunku do kontroli również był gatunkowo zróżnicowany i zależał od rodzaju działającego czynnika stresowego. W przypadku *X. nemoralis* względny wskaźnik zmian glutationu był najwyższy w grupie głodzonych samic, podczas gdy u *A. labyrinthica* stopień wzrostu stężenia tego tripeptydu był podobny u przedstawicieli obu płci w każdej z grup doświadczalnych. Odsetek komórek ginących na drodze nekrozy okazał się niższy w grupach pajaków, u których notowano wyższe stężenie glutationu, co może potwierdzać cytoprotekcyjną funkcję wymienionego związku.

Dane literaturowe wskazują, że także w odniesieniu do innych parametrów antyoksydacyjnych ich poziom może być gatunkowo zróżnicowany, w zależności od rodzaju działających czynników. Efekt działania dimetoatu u konika polnego *Chorthippus brunneus* przejawiał się w postaci istotnego względem kontroli zmniejszenia aktywności SOD, GPOX, GSTPx, a także obniżenia poziomu zredukowanego glutationu (GSH) (AUGUSTYNIAK i in., 2005). W przypadku małży *Anodonta cygnea* eksponowanych na zanieczyszczenia, w których przeważały pestycydy, wykazano słabe zależności między aktywnością CAT i stężeniem zastosowanych substancji chemicznych (ROBILLARD i in., 2003). Autorzy tej pracy podkreślają jednak, że istotną rolę w regulacji aktywności CAT, a także GST i AChE mogą u tego gatunku odgrywać czynniki abiotyczne, takie jak temperatura czy pH. Z kolei badania DURMAZA i in. (2006), przeprowadzone na pielęgnicy nilowej (*Oreochromis niloticus*), wskazują, że ekspozycja ryb na pestycyd fosforoorganiczny indukowała wytwarzanie rodników ponadtlenkowych w przewodzie pokarmowym, co stymulowało aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Słabe reakcje na stres w odniesieniu do SOD i CAT wykazano

natomiast w gruczołach jelita oraz w skrzelach małży *Unio tumidus*, eksponowanych w warunkach laboratoryjnych przez 3 doby na miedź i/lub pestycyd. Aktywność SOD nie zmieniała się istotnie względem kontroli, z kolei aktywność CAT w tych warunkach malała. W badaniach tych bardziej czułe reakcje wykazano w odniesieniu do poziomu GSH, GPOX i GR, dlatego też enzymy te proponuje się jako dobre biomarkery ogólnego stresu w organizmach (DOYOTTE i in., 1997). Także i w tej pracy zaznaczyły się międzygatunkowe różnice w reakcjach na stres wywołany ekspozycją na czynniki o różnym charakterze. Szczególnie wyraźnie różnice te uwidoczniły się w przypadku analizy aktywności SOD i CAT, których poziom w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica* nie zmieniał się lub istotnie się obniżał względem grupy kontrolnej (np. w grupie samic i samców z Olkusza, niezależnie od rodzaju stosowanego stresora), gdy tymczasem u *X. nemoralis* enzymy te stanowiły ważny element obrony antyoksydacyjnej, o czym świadczyło nasilenie ich aktywności we wszystkich grupach doświadczalnych. W przypadku pogońcowatych (*X. nemoralis*) o cytoprotekcyjnej funkcji wymienionych enzymów mogą świadczyć także pozytywne zależności, jakie znaleziono między aktywnością SOD i/lub CAT i liczbą komórek ginących na drodze nekrozy lub apoptozy. Jeśli porówna się z nimi pająki tunelowe (*A. labyrinthica*), to zależności między prezentowanymi parametrami były słabe lub cechowały je wzajemne ujemne korelacje.

5.3. Reakcje samic i samców pajaków w odpowiedzi na stres

Dotychczasowe badania porównawcze uwzględniające płęć pajaków skupiały się głównie na cechach behawioralnych i fizjologicznych. W pracach tych podkreślano przede wszystkim różnice między samicami i samcami dotyczące zachowań seksualnych, długości życia (FOELIX, 1996), tempa metabolizmu (ANDERSON,

1974; TANAKA, ITO, 1982) czy przeżywania niekorzystnych warunków, jak na przykład okresy niedoboru pożywienia (WISE, 1993), niska lub wysoka temperatura (PULZ, 1987; SCHMALHOFER, 1999; LI, JACKSON, 1996), narażenie na pestycydy (HOF i in., 1995) i inne. Mierząc wybrane wskaźniki detoksykacyjne u pajaków, zwraca także uwagę duża tolerancja samic na działanie zanieczyszczeń przemysłowych (WILCZEK i in., 2003; 2004; 2007).

Istotnych informacji na temat komórkowych różnic między płciami w reakcjach pajaków na stres dostarczyły rezultaty przedstawiające wielkości analizowanych parametrów, które zmierzono u osobników odłowionych z poszczególnych stanowisk bez narażania ich na dodatkowe czynniki stresowe (kontrola). Liczba komórek eksponujących fosfatydyloserynę na powierzchni błony komórkowej w komórkach gruczołów jelita środkowego samców *X. nemoralis* i *A. labyrinthica* ze stanowiska silnie zanieczyszczonego była istotnie niższa niż u samic, co sugeruje, że procesy apoptotyczne u samców tych gatunków zachodzą znacznie słabiej. Jedną z przyczyn różnic między płciami w poziomie zmian apoptotycznych było u wymienionych gatunków utrzymywanie się wysokiego stężenia metali w gruczołach jelita środkowego samców. Jak przedstawiono wcześniej, samce pajaków, niezależnie od stopnia zanieczyszczenia stanowisk metalami ciężkimi, cechowało średnio 2-krotnie wyższe stężenie Cd, Cu i Zn zarówno w całych osobnikach, jak i w gruczołach jelita środkowego (WILCZEK i in., 2003; 2005; 2007). Efekty modulatoryjnego działania metali na procesy apoptozy stwierdzali również inni badacze. Stosunkowo wcześniej udokumentowano na przykład udział cynku w regulacji tego procesu u ssaków (ELMES, 1977). Metal ten w niskich stężeniach stymulował procesy apoptotyczne w kryptach jelita cienkiego szczurów. Zwiększoną częstość komórek apoptotycznych odnotowano także u osobników dorosłych, pozostających na diecie niskocynkowej oraz w nabłonku układu nerwowego płodów szczurzych matek utrzymywanych na takiej diecie. Deficyt cynku uwrażliwia komórki na inne induktory apoptozy, jego suplementacja zaś prowadząca do wzrostu jego

wewnątrzkomórkowego stężenia stanowi czynnik ochraniający wiele typów komórek przed apoptozą. Także w badaniach *in vitro* cynk oraz kadm hamowały apoptozę w tymocytach ssaków (CHUKHLOVIN i in., 2001). PRUSKI i DIXON (2002) wykazali, że Cd hamował lub opóźniał apoptozę wywołaną stresem oksydacyjnym u małży *Mytilus edulis*. Metal ten był także efektywnym inhibitorem aktywności kaspazy-3, gdyż nawet w niskich stężeniach, w blisko 60% hamował wymieniony enzym w komórkach jajnika chomika (YUAN i in., 2000). Wysokie stężenia metali w komórkach gruczołów jelita środkowego samców pajaków zatem mogły skutkować hamującym działaniem w odniesieniu do procesów apoptotycznych. Z kolei odsetek komórek nekrotycznych tylko w przypadku kontrolnych samców *X. nemoralis* z Olkusa był istotnie wyższy niż u samic, podczas gdy u *A. labyrinthica* samice i samce nie różniły się pod tym względem. Wyższy odsetek komórek nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego samców *X. nemoralis* w porównaniu z samcami *A. labyrinthica* może wskazywać na mniejszą tolerancję przedstawicieli pogońcowatych na wzrastające stężenie metali w wymienionym narządzie. Nasilenie zmian nekrotycznych bowiem może sprzyjać zmianom zapalnym i obniżeniu się kondycji fizjologicznej gruczołów jelita środkowego. Jest to prawdopodobne, ponieważ stężenie Cu i Pb w gruczołach jelita środkowego *X. nemoralis*, niezależnie od stopnia zanieczyszczenia stanowisk badawczych, było średnio 2-krotnie wyższe niż w wymienionym narządzie *A. labyrinthica* (WILCZEK i in., 2007) — tab. 3.2.

W odniesieniu do zmian apoptotycznych i nekrotycznych samice różniły się od samców. Nasilenie apoptozy w gruczołach jelita środkowego samic należących do grup kontrolnych, w porównaniu z samcami, przejawiało się wysokim odsetkiem komórek pozytywnie reagujących z aneksyną V (Aneksyna⁺/PI⁻), co sugeruje, że apoptoza jest mechanizmem ochronnym, dzięki któremu możliwe jest usuwanie uszkodzonych komórek i potencjalnie zagrażających organizmowi. Ponadto niska frekwencja komórek nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego sa-

mic wskazuje, że poziom stresu w naturalnym środowisku życia (stopień obciążenia metalami ciężkimi) nie upośledza procesów metabolicznych w komórkach wymienionego narządu.

W literaturze przedmiotu brak jest danych umożliwiających porównanie komórkowych reakcji na stres u samic i samców pajaków wobec różnych jakościowo i ilościowo działających czynników. W przypadku pajaków wykazano, że różnice między płciami w odpowiedzi na zastosowane czynniki stresogenne były gatunkowo zróżnicowane, lecz zależne od rodzaju działającego czynnika. W przypadku *X. nemoralis* najsilniejsze efekty w odniesieniu do wartości kontrolnych uzyskano u głodzonych samców oraz tych narażonych na stres termiczny wraz z pestycydem. Przejawem działania wymienionych stresorów było zwiększenie liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami w gruczołach jelita środkowego i, prawdopodobnie jako konsekwencja tych zmian, wzrost odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Ilościowy wzrost wymienionych parametrów zanotowano także u samic, lecz ich nasilenie było mniejsze niż u samców. W przypadku samców *A. labyrinthica* zmiany nekrotyczne okazały się bardziej zaawansowane niż u samic i wystąpiły tylko w grupie T+P. Wraz ze zwiększeniem odsetka komórek nekrotycznych w odpowiedzi na łączony stres u tych pajaków wzrosła aktywność proteazy kaspazopodobnej i liczba komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami. Interesujące, że w przypadku samców pajaka sieciowego nie zmienił się w takich warunkach odsetek komórek apoptotycznych, gdy tymczasem u samic uległ on znacznemu podwyższeniu. Nie jest wykluczone, że dla samców *A. labyrinthica* był to na tyle silny stres, że powodował rozległe zmiany w obrębie mitochondriów, w konsekwencji prowadzące do nekrozy. Silne efekty komórkowe u przedstawicieli Agelenidae wystąpiły także w przypadku głodzenia, ale i tu zaznaczyły się wyraźne różnice między płciami. Zwiększenie częstości nekroz było charakterystyczne dla samic, u samców zaś takie reakcje dotyczyły zmian apoptotycznych. Może to wskazywać na większą tolerancję głodu u samców tego gatunku pajaka niż u samic.

Fakt mniejszej wrażliwości samic niż samców na szeroko pojęty stres potwierdzono w różnych grupach systematycznych, zarówno u kręgowców (BORRAS i in., 2003; CARRANZA i in., 2004; SANZ i in., 2007), jak i bezkręgowców (KURTZ, SAUER, 2001; KLOSTERHAUS i in., 2003). Spośród wielu przyczyn tych różnic na pierwszy plan wysuwa się sprawniejsza ochrona antyoksydacyjna u samic niż u samców, prawdopodobnie związana z rolą czynnika hormonalnego. W badaniach na ssakach wykazano na przykład, że w mitochondriach niektórych narządów samic szczurów powstaje mniej RFT niż u samców, dzięki czemu średni czas życia samic jest dłuższy (BORRAS i in., 2003; JANG i in., 2004). VINA i in. (2005) prowadząc badania m.in. na szczurach linii Fisher 344 i Wistar, podkreślili, że przyczyną obserwowanych różnic we wrażliwości na czynniki stresogenne między samcami i samicami jest sprawna obrona antyoksydacyjna związana zazwyczaj z wyższą aktywnością Mn-SOD oraz peroksydaz glutationowych u samic, za co odpowiada wyższe stężenie estrogenów. Według tych autorów, ochronny mechanizm działania wymienionych hormonów steroidowych prawdopodobnie jest związany z regulacją ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (VINA i in., 2005). W niektórych pracach podkreśla się także ochronną rolę estrogenów w regulacji stężenia zredukowanego glutationu (WANG i in., 2003; CHEN, YAGER, 2004), który przeciwdziałając powstawaniu reaktywnych form tlenu w łańcuchu mitochondrialnym, pośrednio wykazuje antyapoptotyczne właściwości (CHEN i in., 2000). Analiza wskaźników apoptotycznych u samic i samców szczurów linii Fisher 344 nie potwierdziła natomiast różnic w poziomie wskaźników apoptotycznych, w tym takich enzymów, jak kaspaza-3 czy kaspaza-9 (SANZ i in., 2007). Badania prowadzono jednak na młodych osobnikach, nie jest więc wykluczone, że takie różnice mogą się pojawić u osobników starszych.

Układ endokrynnny bezkręgowców, w tym pajaków, różni się istotnie od tego u kręgowców, toteż poszukiwanie hormonalnych przyczyn w różnicach odpowiedzi na stres w tej grupie stawonogów jest trudne, także z uwagi na fakt,

że kontrola endokrynną u pajaków jest nadal słabo poznana. Na przykład obecność ekdystero-
idów, które u wszystkich stawonogów, zarówno
samców jak i samic, spełniają funkcję m.in. hor-
monów wzrostu, w przypadku pajaków potwier-
dzono tylko u paru gatunków: *Opilio ravennae*
(ROMER, GNATZY, 1981), *Pisaura mirabilis*
(BONNARIC, DE REGGI, 1997), *Coelotes terrestris*
i *Tegenaria domestica* (TRABALON i in., 1992).
Hormony te uczestniczą u tych zwierząt w witel-
logenecie, modyfikują też zachowania seksu-
alne samic w okresie godowym (TRABALON i in.,
2005). Wykazano na przykład, że przed zapłod-
nieniem poziom 20-hydroksyekdysonu (20E)
u samic pajaków jest wysoki, przyczyniając się
do zmniejszenia kanibalizmu, dzięki czemu
samce w okresie reprodukcyjnym mogą bez ry-
zyka przebywać w obecności samic (TRABALON
i in., 2005).

Wiele związków chemicznych może silnie
oddziaływać na układ hormonalny bezkręgow-
ców, pośrednio wpływając na procesy metabo-
liczne. Zwrócenie uwagi na regulacyjną funkcję
układu endokrynnego w odniesieniu do reakcji
na stres i możliwość odmiennych reakcji obu
płci na czynniki stresowe sugerują wyniki badań
przebiegane na bezkręgowcach wodnych. Ekspo-
zycja widłonogów *Amphiascus tenuiremis* na in-
sektycyd (fipronil) opóźniała linienie i osiągnię-
cie zdolności reprodukcyjnej u samców, podczas
gdy u samic pestycyd ten nie wywoływał po-
dobnych zmian (CARY i in., 2004). Także w ba-
daniach skorupiaków *Palaemonetes pugio* dłu-
goterminowa ekspozycja na piren zmieniała proce-
sy linienia i opóźniała osiągnięcie dojrzałości
płciowej przez samce tego gatunku (OBERDÖR-
STER i in., 2000). W przypadku samców wymie-
nionego gatunku skorupiak zastosowany
związek mógł zmieniać biosyntezę 20-hydroksy-
ekdysonu lub aktywność hormonu hamującego
linienie (MIH), w konsekwencji zaburzając pro-
cesy reprodukcji (RODRIGUEZ i in., 2007). Wyni-
ki badań OBERDÖRSTER i in. (2000) wskazują po-
nadto, że piren tylko u samców *P. pugio* wy-
woływał podwyższenie aktywności ECOD
(deetylaza etoksykumaryny). Z kolei u roz-
gwiazdy *Asterias rubens* polichlorowane bifenyle
silniej u samic niż u samców aktywowały hy-

droksylazę benzo(α)pirenu (DEN BESTEN i in.,
1991). Nie jest wykluczone, że ksenobiotyki
włączone w szlaki enzymatycznej detoksykacji
pośrednio oddziałują na syntezę określonych
hormonów. Wykazano bowiem, że w szlakach
biosyntezy ekdyzonu uczestniczą na przykład
monooksygenazy cytochromu P450 — ważne
elementy I fazy enzymatycznej biotransformacji
ksenobiotyków. Ekspresja genu *CYP45*
w wątrobotrzustce *Homarus americanus* była
proporcjonalna do zmian poziomu ekdysteroidu
w hemolimfie po okresie linienia (SYNDER,
CHANG, 1991). Podobnie, gdy bezkręgowcom
tym podano egzogeny 20-hydroksyekdyson
(20E), nastąpiło istotne nasilenie ekspresji
CYP45 (SNYDER, 1998). Hormonopodobne efek-
ty stymulacji ekspresji wymienionych genów
wywoływały także insektycydy polichlorowe
czy fenobarbital w wątrobotrzustce skorupiaków
i w gruczołach trawiennych małży (GALLI i in.,
1988). Badania prowadzone na *H. americanus*
eksponowanych przez dobę na insektycyd poli-
chlorowy — heptachlor wskazują, że związek
ten stymulował ekspresję *CYP45* i *hsp70*, mody-
fikując procesy linienia (SYNDER, MULDER,
2001). Ingerencja ksenobiotyków w szlaki meta-
boliczne związków hormonalnych może więc
skutkować określonymi dysfunkcjami, których
konsekwencje mogą być odmienne w zależności
od płci.

W pracach podkreśla się, że metabolizm sam-
ców sprzyja generowaniu reaktywnych form tle-
nu. Potwierdzają to m.in. badania prowadzone
na ssakach (VINA i in., 2005), rybach (WINZER
i in., 2001; VEGA-LOPEZ i in., 2007), owadach (LI
i in., 2005; McCLELLAN-GREEN i in., 2007) czy
skorupiakach (MOURENTE, DIAZ-SALVAGO, 1999).
Odnosząc się do poziomu parametrów antyoksy-
dacyjnych zmierzonych w gruczołach jelita środ-
kowego samców grupy kontrolnej *A. labyrinthi-
ca* charakterystyczne było wyższe niż u samic
stężenie glutationu całkowitego oraz aktywność
SOD, podczas gdy u *X. nemoralis* zwracała uwa-
gę wyższa u samców niż u samic aktywność
CAT przy podobnym stężeniu glutationu u obu
płci. Można przyjąć, że czynniki stresogenne
w gruczołach jelita środkowego samców bardziej
niż u samic stymulowały syntezę reaktywnych

form tlenu, co manifestowało się uruchomieniem określonych reakcji antyoksydacyjnych. Większe nasilenie reakcji antyoksydacyjnych u samców w porównaniu z samicami w odpowiedzi na stres chemiczny zanotowano także u samców ryb *Girardinichthys viviparus*, u których ekspozycja na polichlorowane bifenyle stymulowała procesy lipoperoksydacji, wzmacniała też aktywność SOD i CAT w stopniu wyższym niż u samic (VEGA-LOPEZ i in., 2007). Nasilenie lipoperoksydacji oraz wzmożenie procesów usuwania reaktywnych form tlenu było większe w hepatocytach samców niż samic storczy *Platichthys flesus* eksponowanych na nitrofurantoinę (WINZER i in., 2001). Z kolei w przypadku samców *Oxya chinensis* (Orthoptera) w odpowiedzi na kadm zanotowano silną stymulację aktywności CAT (LI i in., 2005).

W gruczołach jelita środkowego samców obu gatunków pajków po ekspozycji na dimetoat (P), wysoką temperaturę (T) i stres łączony (T+P) nasiliły się reakcje sprzęgania, co uwidoczniło się podwyższoną względem wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej aktywnością GST, podczas gdy głodzenie (G) wywołało obniżenie aktywności tego enzymu (tab. 5.3 i 5.4). Podobnych reakcji nie odnotowano u samic z wymienionych grup, u których aktywność GST zmieniała się w niewielkim stopniu. Nie jest wykluczone, że u samców analizowanych gatunków GST odgrywa znaczącą rolę w detoksykacji enzymatycznej związków organicznych. Fakt ten potwierdzają także wcześniejsze badania wskazujące, że samce pogońcowatych *P. lugubris* miały wyższą aktywność GST niż samice, lecz dotyczyło to tylko osobników z terenów słabo zanieczyszczonych (WILCZEK i in., 2004). Większy udział GST u samców niż u samic w detoksykacji związków organicznych potwierdzają także badania na myszach w odniesieniu do benzo(α)pirenu (SHARMA i in., 1997) oraz na rybach w odniesieniu do parakwatu (FIGUEIREDO-FERNANDES i in., 2006). Z innych badań wynika, że płeć nie zawsze w sposób jednoznaczny determinuje aktywność GST. Aktywność tego enzymu u innych pogońcowatych, *Lycosa hilaris*, eksponowanych na dwa fosforoorganiczne insektycydy: diazinon i chloropirifos nie zmie-

niała się istotnie u samic i samców, chociaż związki te były bardziej toksyczne dla samców niż samic, gdyż ich śmiertelność była wyższa (VAN ERP i in., 2002). Z kolei STONE i in. (2002) wykazali, że stopień zanieczyszczenia stanowisk badawczych metalami ciężkimi nie różnicował aktywności GST u samców chrząszczy *Pterostichus oblongopunctatus*. Aktywność tego enzymu nie zmieniała się również u samców *D. melanogaster* w odpowiedzi na fenobarbital i atrazynę (LE GOFF i in., 2006).

W przypadku samców *A. labyrinthica* w odpowiedzi na pestycyd (P) i stres łączony (T+P) wykazano większą niż u samic stymulację aktywności peroksydaz glutationowych. Wysoka aktywność tych enzymów w wymienionych grupach może wskazywać na zjawisko synergizmu między zastosowanymi czynnikami, ponieważ efekt temperatury i pestycydu działających pojedynczo był zdecydowanie słabszy niż łączne działanie obu czynników. Także samce *X. nemoralis* z wymienionych wcześniej grup doświadczalnych cechowało wyższe niż u samic stężenie glutationu całkowitego oraz wyższa aktywność GPOX i GSTPx.

Na podstawie tych wyników można założyć, że ważnym elementem obrony dla samców pajków *X. nemoralis* jest GSH, zarówno przez jego udział w bezpośrednim wiązaniu metali, jak i pośrednio przez enzymatyczną neutralizację reaktywnych form tlenu powstających w wyniku procesów metabolicznych zachodzących w organizmie i indukowanych przez określone czynniki egzogenne. W przypadku samic i samców drugiego gatunku stężenie glutationu było podobne u obu płci, lecz istotnie wyższe niż w kontroli. Pokazuje to, że bez względu na płeć funkcja ochronna glutationu jest znacząca.

Stwierdzone zależności między stężeniem glutationu całkowitego i liczbą komórek ginących na drodze nekrozy i apoptozy u przedstawicieli obu płci *A. labyrinthica* i samców *X. nemoralis* z grupy P i T+P były wysoko istotne. W przypadku samic gatunku niesieciowego zależności te zaznaczyły się słabiej. Być może stymulacja produkcji glutationu w odpowiedzi na stres u pajków z wymienionych grup była niewystarczająca w stosunku do rzeczywistego za-

potrzebowania organizmu, na co wskazuje wzrost liczby ginących komórek. Potwierdzono bowiem, że w przebiegu apoptozy indukowanej działaniem czynników egzogennych następuje zwykle obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia zredukowanego glutationu (SHIMIZU i in., 1997). Nie jest jednak do końca jasne, czy obniżenie stężenia GSH poprzedza proces apoptozy czy też jest to reakcja odwrotna, chociaż według niektórych badaczy samo obniżenie stężenia glutationu nie jest wystarczającym czynnikiem indukującym apoptozę (CHANDRA i in., 2000). Redukcja zasobów glutationu prawdopodobnie nie wynika z hamowania jego syntezy czy utleniania formy zredukowanej GSH do GSSG, ale zwiększenia jego wykorzystania w procesach metabolicznych, a także jego wpływu poza komórkę (VAN DEN DOBBELSTEEN i in., 1996). Tripeptyd ten jest syntezowany głównie w cytosolu, skąd jest transportowany m.in. do mitochondriów i jądra komórkowego. Jądrowa pula glutationu, w porównaniu z magazynami cytoplazmatycznymi, wydaje się bardziej odporna na działanie związków, które przyspieszałyby jego wyciek z tego organellum, co sugeruje ochronną rolę glutationu dla DNA i białek jądrowych przed uszkodzeniami (CHANDRA i in., 2000).

Udokumentowano, że długotrwałe obciążenie organizmu ksenobiotykami, prowadzące do obniżenia stężenia GSH, może być przyczyną zmian mutagennych (VIARENGO, 1989; SMITH, 1991). Wykazano także, że 10—15% komórkowych zasobów zredukowanego glutationu jest zlokalizowane w mitochondriach, obniżenie zaś mitochondrialnej puli tego tripeptydu sprzyja produkcji reaktywnych form tlenu, czego skutkiem jest nadmierne gromadzenie się nadtlenu wodoru (TAN i in., 1998). W sytuacji gdy związek ten nie może być skutecznie usuwany, dochodzi do generowania rodnika hydroksylowego, którego silna reaktywność prowadzi do rozległych uszkodzeń mitochondriów, uwolnienia czynników proapoptycznych i w rezultacie do śmierci komórki (FERNANDEZ-CHECA, 2003).

5.4. Przedekspozycyjne wskaźniki stresu u zwierząt z terenów referencyjnych i silnie zanieczyszczonych

Badania wskazują na możliwość odmiennych reakcji na stres populacji, które zamieszkują tereny w różnym stopniu zanieczyszczone, także metalami ciężkimi. Zakłada się przy tym, że organizmy występujące na terenach zanieczyszczonych są znacznie bardziej wrażliwe na dodatkowe stresory niż osobniki z terenu referencyjnego i pojawienie się nowego czynnika bądź nasilenie już istniejącego może łatwiej zakłócać homeostazę organizmu. Większą wrażliwość organizmów ze środowisk skażonych metalami, traktowanych dodatkowo czynnikami stresogennymi o różnym charakterze, wykazano na przykład u drapieżnych chrząszczy *P. oblongopunctatus*. Zwierzęta ze środowiska silnie zanieczyszczonego cynkiem i ołowiem, a następnie głodzone lub traktowane dimetioatem w warunkach laboratoryjnych, przejawiały większą śmiertelność w porównaniu z osobnikami poddanymi takiemu samemu działaniu, ale pochodzącymi z terenów w mniejszym stopniu zanieczyszczonych (STONE i in., 2001).

Z niniejszych badań wiadomo, że odpowiedzi komórkowe, mierzone poziomem analizowanych wskaźników u pajaków z silnie zanieczyszczonego środowiska (Olkusz), różniły się od tych, które zarejestrowano u osobników z terenu referencyjnego (Pilica), a jednocześnie były gatunkowo zróżnicowane i niejednokrotnie odmienne u przedstawicieli obu płci w obrębie gatunku. W pracach zajmujących się problemem preekspozycji rzadko różnicuje się reakcje metaboliczne organizmów ze względu na płeć osobników. Uwzględnienie płci u pajaków jest istotne, gdyż w tej pracy wykazano różnice w wielkości analizowanych parametrów między samcami i samicami pajaków z obu stanowisk, bez wprowadzania dodatkowych czynników stresogennych. Samice *X. nemoralis* i *A. labyrinthica* z Olszusa cechował wyższy niż u osobników z Pilicy odsetek komórek apoptotycznych. Natomiast dla

samców *X. nemoralis* z Olkusza wykazano większy odsetek komórek nekrotycznych. Rezultaty te, co podkreślano wcześniej, wskazują na większą wrażliwość samców w odniesieniu do warunków panujących na stanowisku silnie zanieczyszczonym. Dają również podstawy do wykorzystywania wskaźników zmian apoptotycznych i nekrotycznych jako biomarkerów oceny narażenia lub wykazania skutków działania zanieczyszczeń na organizm. Częstość występowania apoptozy i nekrozy jako biomarkera stresu antropogenicznego sugerują m.in. badania prowadzone na zimnicach *Limanda limanda*, eksponowanych na kadm oraz polichlorowane bifenyle: PCB 118 i PCB 77. Ekspozycja zwierząt zarówno na metal jak i PCB 118 skutkowała nasileniem zmian apoptotycznych ocenianych przez fragmentację DNA, podczas gdy PCB 77 prowadziło do zmian nekrotycznych (PIECHOTTA i in., 1999).

Odnosząc się do parametrów antyoksydacyjnych, które analizowano w gruczołach jelita środkowego pajaków z grup kontrolnych, samice i samce *X. nemoralis* z Olkusza cechowało wyższe niż u osobników z Pilicy stężenie glutationu, przy czym dla samic tego gatunku podobne wzorce dotyczyły także enzymów związanych z metabolizmem wymienionego tripeptydu. Dla obu płci *A. labyrinthica* z zanieczyszczonego stanowiska w Olkuszu znamienne był wzrost odsetka komórek Mt pozytywnych w porównaniu z wartościami kontrolnymi stwierdzonymi u pajaków z Pilicy. W tym ostatnim przypadku można założyć, że *A. labyrinthica* w warunkach stresu związanego z chronicznym oddziaływaniem metali ciężkich w większym stopniu niż *X. nemoralis* wykorzystują metalotioneiny, wspomagając inne mechanizmy uruchamiane dla neutralizacji wymienionych ksenobiotyków (np. magazynowanie w granulach). W przypadku *X. nemoralis* analogiczną funkcję może spełniać glutation. Odmienne gatunkowo reakcje na długotrwały kontakt z zanieczyszczeniami potwierdzają także badania prowadzone na dwóch gatunkach Isopoda: *Oniscus asellus* i *Porcellio scaber*, które odławiano na różniących się stopniem zanieczyszczenia stanowiskach w Avonmouth (Wielka Brytania) oraz

w Tübingen (Niemcy) jako stanowisku referencyjnym. W wątrobotrzustce *O. asellus*, wraz ze zmniejszaniem się odległości od głównego źródła zanieczyszczeń, wzrastała liczba i rozmiary sferytów. Malały także rezerwy energetyczne, gdyż zmniejszały się zapasy tłuszczów i glikogenu. Podobnych zmian nie stwierdzono jednak u *P. scaber*, u którego analizowane parametry utrzymywały się na stałym poziomie bez względu na stopień zanieczyszczenia stanowisk badawczych.

Uzyskane rezultaty wskazują, że przeżycie w warunkach długotrwałego stresu umożliwiając osobnikom wymienionych gatunków odmienne strategie adaptacyjne, które w różnym stopniu naruszały rezerwy energetyczne ustroju na przykład przez selektywny wybór pokarmu, usuwanie metali wraz z kałem, produkcję białek Hsp70 itp. (SCHILL, KÖHLER, 2004b).

W odniesieniu do pajaków wyraźnie zaznaczyły się także różnice międzygatunkowe i między płciami w kontrolnym poziomie białek stresu Hsp70, zależnie od miejsca ich odłowu. Liczba komórek Hsp70 pozytywnych u samic obu gatunków z Olkusza była istotnie niższa niż u pajaków pochodzących z Pilicy. KÖHLER i in. (2000), badając zmiany stężenia Hsp70 w populacjach Isopoda z zanieczyszczonych rejonów Niemiec, wykazali, że długoterminowa ekspozycja na zanieczyszczenia u tych bezkręgowców może się przejawiać niskim poziomem wymienionych białek stresu. Podobne strategie obserwowano w przypadku skorupiaków *P. scaber* zamieszkujących zanieczyszczone metalami tereny południowej Anglii, u których również nie stwierdzono zwiększonego poziomu Hsp70 (ARTS i in., 2004). Być może, utrzymywanie niskiego poziomu białek stresu u pajaków w warunkach silnej presji zanieczyszczeń przemysłowych jest możliwe, gdyż nasilają się inne reakcje obronne. Wobec tego stwierdzone reakcje metaboliczne u samic i samców obu gatunków pajaków na terenach w różnym stopniu zanieczyszczonych mogły stanowić wyraz odpowiedzi kompensacyjnych lub adaptacyjnych na warunki panujące w określonym środowisku.

5.4.1. Komórkowe reakcje samic i samców pajaków na dodatkowe czynniki stresogenne a wcześniejsza preekspozycja na zanieczyszczenia

W pracy wykazano, że rodzaj uruchamianych reakcji komórkowych oraz stopień ich nasilenia u przedstawiciela pogońcowatych *X. nemoralis* zależał zarówno od płci osobników, miejsca ich odłowu, jak i rodzaju zastosowanych czynników stresogennych. Samice pogońcowatych z Olkusza w grupach eksponowanych na szok termiczny, dimetoat i oba czynniki łącznie w większym stopniu niż samice z Pilicy nasilały aktywność proteazy kaspazopodobnej. Również wzrost odsetka komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami był większy u samic z Olkusza niż u samic ze stanowiska referencyjnego. W konsekwencji więcej komórek ginęło na drodze nekrozy, co szczególnie uwidoczniło się w gruczołach jelita środkowego samic po szoku termicznym i w stresie łączonym (T+P). Nasilenie zmian nekrotycznych w grupach T, P oraz T+P samców w porównaniu z samicami było większe u pajaków ze stanowiska referencyjnego. W przypadku pozostałych wskaźników śmierci komórkowej zmiany były podobne do samic, aczkolwiek zależały od rodzaju działającego stresora. W odpowiedzi na wszystkie czynniki stresogenne liczba komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami wzrastała bardziej u osobników odłowionych w Olkuszu. Z kolei u samców ze stanowiska zanieczyszczonego aktywność proteazy kaspazopodobnej i liczba komórek apoptotycznych przewyższały wartości notowane u samców z Pilicy, lecz tylko w grupach T+P oraz G. Wynika z tego, że samce ze stanowiska referencyjnego są bardziej wrażliwe na stosowane stresory niż samce z Olkusza, podczas gdy w przypadku samic zwiększona wrażliwość cechuje osobniki ze stanowiska silnie zanieczyszczonego.

Analiza zmian ilościowych uwzględniających parametry antyoksydacyjne wykazała, że rodzaj uruchamianych reakcji obronnych zależał od płci

pajaków. Preekspozowane samice *X. nemoralis* miały wyższą aktywność SOD i CAT niż osobniki z terenu referencyjnego, niezależnie od rodzaju działających czynników stresogennych, gdy tymczasem reakcje antyoksydacyjne preekspozowanych samców nie różniły się istotnie i były niezależne od stanowiska. Działanie szoku termicznego na osobniki pochodzące ze stanowiska w okolicy Olkusza spowodowało zwiększenie liczby komórek Mt i Hsp70 pozytywnych niezależnie od płci. Wynika z tego, że różnorodne odpowiedzi komórkowe samców i samic pogońcowatych potwierdzają znaczenie płci w tego typu badaniach i wskazują, że traktowanie wszystkich osobników łącznie może nie ujawniać istniejących zależności między poziomem analizowanych parametrów a miejscem bytowania pajaków.

Zdecydowanie bardziej jednoznaczne odpowiedzi na stres zanotowano u obu płci *A. labyrinthica*. Samice i samce tego gatunku z terenu silnie zanieczyszczonego odpowiadały na wszystkie stresory wzrostem liczby komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, wzrostem aktywności proteazy kaspazopodobnej oraz nasileniem zmian nekrotycznych. Chociaż samce reagowały silniej niż samice, to, niezależnie od płci i stanowiska, efekty te dotyczyły głównie osobników poddanych łącznemu działaniu dwóch stresorów (T+P). Także reakcje antyoksydacyjne były bardziej wzmożone u pajaków ze stanowiska w Olkuszu, lecz tylko w odniesieniu do takich parametrów, jak: GSH + GSSG, GPOX, GST. Z kolei samice i samce z terenu referencyjnego miały większy odsetek komórek Mt pozytywnych niż osobniki z Olkusza. Niezależnie od stanowiska liczba komórek Hsp70 pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pajaków tego gatunku wzrosła istotnie w każdej grupie eksperymentalnej. Podobny sposób reagowania na określone czynniki stresogenne samic i samców pajaków z rodziny Agelenidae może oznaczać, że w przypadku *A. labyrinthica* głównym czynnikiem różnicującym poziom wskaźników śmierci komórkowej i enzymatycznych reakcji antyoksydacyjnych jest miejsce ich bytowania, płeć zaś nie różnicuje rodzaju uruchamianych reakcji, chociaż w zależności od

płci zmienia się stopień nasilenia odpowiedzi antyoksydacyjnych.

W innych pracach też podkreśla się, że wcześniejszy kontakt z zanieczyszczeniami może mieć istotny wpływ na tolerancję określonych stresorów. Aktywność GST na przykład u koników polnych *Chorthippus brunneus* (Orthoptera) z terenów słabo zanieczyszczonych obniżała się, jeśli w laboratorium poddano je krótkotrwałemu działaniu kadmu. Osobniki tego gatunku z terenów zanieczyszczonych reagowały podwyższeniem aktywności GST zarówno podczas krótkotrwałej, jak i długotrwałej ekspozycji na metal (AUGUSTYNIAK, MIGULA, 2000). Potwierdzają to badania mrówek *Formica polyctena* z terenów zanieczyszczonych, u których w odpowiedzi na nadmiar kadmu podawanego z pokarmem notowano wzrost aktywności GST (MIGULA, GŁOWACKA, 1996). Pomiar czasu retencji czerwieni obojętnej użyty jako miara stabilności błon lizosomalnych w hemocytach pre- i niepreeksponowanych na zanieczyszczenia dżdżownic *Eisenia fetida*, które w laboratorium traktowano subletalnymi stężeniami $Pb(NO_3)_2$, wskazuje natomiast, że był on znacznie krótszy u osobników preeksponowanych (REINECKE, REINECKE, 2003). Dżdżownice z terenów niezanieczyszczonych, przetrzymywane przez 4 tygodnie w różnych stężeniach wymienionego związku, charakteryzowały się wyraźną zależnością czasu retencji czerwieni obojętnej a stężeniem ołowiu w tkankach. Podobnych efektów nie obserwowano jednak u zwierząt, które miały wcześniejszy kontakt z metalem. Zdaniem tych autorów, różna wrażliwość zwierząt żyjących w środowisku zanieczyszczonym metalami może utrudniać wnioskowanie na temat tolerancji określonych czynników stresowych na podstawie wybranych biomarkerów. W tym przypadku była to zróżnicowana lizosomalna odpowiedź na Pb, gdy reakcje w laboratorium badano na osobnikach pochodzących z terenów o różnym stopniu zanieczyszczenia. Tego typu analizy mają znaczenie, gdy porównywane są reakcje organizmów pochodzących z tego samego stanowiska lub gdy wiadomo, jakich skutków można się spodziewać w odniesieniu do danego biomarkera w przypadku zwierząt żyjących na terenach zanie-

czyszczonych określonymi substancjami chemicznymi.

Opinie na temat znaczenia preekspozycji na zanieczyszczenia, w odniesieniu do rodzaju uruchamianych reakcji oraz ich nasilenia, w sytuacji pojawienia się dodatkowych czynników stresogennych mogą się jednak różnić. W pracy KÖHLERA i in. (1999 a) skoczogonki *Tomocerus flavescens* z zanieczyszczonych stanowisk miały w fazie początkowej doświadczenia wyższy poziom białek Hsp70 niż *Orchesella bifasciata*, ale oba gatunki w podobny sposób reagowały na zastosowane czynniki stresowe. Z kolei SCHILL i KÖHLER (2004 a) badając kielże *Gammarus fossarum* wykazali, że reakcje metaboliczne osobników tego gatunku, mierzone zmianami wskaźnika ładunku energetycznego adenylatów (AEC), jak również poziomu Hsp70, lipidów i glikogenu, stanowiły fizjologiczną odpowiedź na stres i nie wynikały ze zróżnicowania genetycznego badanych populacji w związku z ich zróżnicowaną ekspozycją na zanieczyszczenia. Osobniki przeniesione z terenów silnie zanieczyszczonych do laboratorium, gdzie wyeliminowano zanieczyszczenia, reagowały słabo, szczególnie w odniesieniu do poziomu Hsp70. We wszystkich przypadkach wartość wskaźnika AEC oraz stosunek ATP do ADP utrzymywały się u tych zwierząt w granicach fizjologicznie optymalnych, podobnie jak poziom lipidów oraz glikogenu, których stężenie nie zależało od stopnia zanieczyszczenia. Na podstawie uzyskanych wyników cytowani autorzy wnioskują, że dla organizmu bardziej istotna jest bieżąca ekspozycja na zanieczyszczenia, a nie preekspozycja na stresor (SCHILL, KÖHLER, 2004 a). Również stonogi *Porcelio scaber* eksponowane na wysokie stężenia ołowiu reagowały wzrostem tempa respiracji bez względu na to, czy pochodziły z terenu niezanieczyszczonego czy też skażonego metalami (KNIGGE, KÖHLER, 2000). We wcześniejszych badaniach KHALIL i in. (1995) nie obserwowali wpływu intoksykacji kadmem na tempo respiracji stonóg (*P. scaber*) zarówno w przypadku zwierząt żyjących w pobliżu kopalni cynku i ołowiu, jak i na stanowisku kontrolnym. Także u raka *Procambarus acutus* tempo respiracji osobników z terenów zanieczysz-

czonych metalami nie różniło się istotnie od zmierzonego u osobników populacji kontrolnej (ROWE i in., 2001). REINECKE i REINECKE (2003) nie wykazali związku między masą ciała dżdżownic preeksponowanych wcześniej na metale i nie eksponowanych w sytuacji, gdy były one w laboratorium traktowane subletalnymi dawkami ołowiu. Biorąc pod uwagę wyniki niniejszej pracy, wydaje się jednak, że w przypadku obu analizowanych gatunków pajaków, pomimo wyraźnych różnic między samicami i samcami w sposobie reagowania na zastosowane stresory, warunki środowiskowe w miejscu ich bytowania wpływają zarówno na rodzaj, jak i stopień odpowiedzi komórkowych. Może to mieć bezpośrednie przełożenie na możliwości tolerowania dodatkowych czynników stresogennych. W przypadku pajaków okazało się jednak, że osobniki z terenów silnie zanieczyszczonych były bardziej wrażliwe na stosowane stresory, niż te, które wcześniej nie były eksponowane na zanieczyszczenia w miejscu swego występowania. Świadczył o tym istotnie wyższy niż u osobników z terenu referencyjnego poziom zmierzonych wskaźników komórkowych i antyoksydacyjnych.

Odpowiedź metaboliczna organizmu może zależeć także od czasu ekspozycji i stopnia nasilenia działającego czynnika. Omułki *Unio tumidus* eksponowane w laboratorium na miedź i/lub thiram (fungicyd), a także w badaniach terenowych poddane działaniu zanieczyszczeń z koksowni, przejawiały obniżenie stężenia GSH, aktywności GPOX oraz GR w skrzelach i w gruczołach jelita środkowego (DOYOTTE i in., 1997). Autorzy uważają, że silne hamowanie aktywności enzymów GPOX i GR (do 70%) oraz zmniejszenie stężenia GSH (do 50%) może stanowić pierwszą fazę odpowiedzi na kontakt z zanieczyszczeniami, przy czym odpowiedź organizmu na zastosowane związki może się zmieniać podczas przedłużającej się ekspozycji. Podobny scenariusz zmian wielkości parametrów systemu antyoksydacyjnego wykazano u ryb *Limanda limanda* eksponowanych na zanieczyszczenia przemysłowe. W pierwszej fazie było to hamowanie, lecz później aktywizacja procesów detoksykacyjnych (LIVINGSTONE i in., 1993). W niniej-

szych badaniach czas ekspozycji pajaków na czynniki stresogenne zapewne był wystarczający do uruchomienia określonych reakcji komórkowych, w tym antyoksydacyjnych, co pozwoliło wykazać międzygatunkowe i międzyplciowe różnice w ich sposobie reakcji na zastosowane stresory. Nie pozwala to, niestety, wnioskować na temat kierunku dalszych zmian analizowanych parametrów w przypadku dłuższej ekspozycji pajaków na wymienione czynniki.

5.4.2. Hsp70 i metalotioneiny u pajaków z terenów w różnym stopniu zanieczyszczonych w odpowiedzi na zadane stresory

W przypadku obu gatunków pajaków największe zmiany liczby komórek Hsp70 pozytywnych w odpowiedzi na stres termiczny zarejestrowano u osobników pochodzących z Olkusza, przy dwukrotnie słabszej odpowiedzi u pajaków z Pilicy (tab. 5.3 i tab. 5.4). Nie można wykluczyć, że zróżnicowane nasilenie wymienionych reakcji u tych drapieżników stanowiło wyraz zdolności kompensacyjnych lub adaptacyjnych do warunków zanieczyszczonego środowiska. Taką możliwość potwierdzają także badania na ślimakach. Ekspozycja tych zwierząt na ekstremalne temperatury zwiększała szansę ich przeżycia przez indukcję syntezy Hsp70 w warunkach wcześniejszego chronicznego narażenia na zanieczyszczenia (SANDERS i in., 1991). Także u zawłotni *Chlamydomonas reinhardtii* poziom białek stresu zależał od czasu ekspozycji na czynniki stresogenne i był utrzymywany w wyższych stężeniach do czasu zmniejszenia się ilości uszkodzonych białek (ADAMS, 1994). Z kolei badania dwóch populacji dorosłych przedstawicieli Isopoda *Oniscus asellus*, pochodzących z leśnych środowisk w okolicach Heidelbergu (Niemcy), w różnym stopniu zanieczyszczonych metalami (kadm, ołów)

i cynkiem) i w laboratorium eksponowanych na kadm i ołów (w podaży pojedynczej i łącznej) wykazały, że u osobników z terenów o mniejszym stopniu zanieczyszczenia indukcja syntezy Hsp70 była słabsza niż u osobników zebranych w bezpośrednim sąsiedztwie kopalni (ECKWERT, KÖHLER, 1997).

W niniejszej pracy stwierdzono, że po ekspozycji pajaków na czynniki stresogenne zaznaczyły się wyraźne, zależne od płci i gatunku, ilościowe różnice dotyczące analizowanych parametrów, zależne także od miejsca, skąd pochodziły te zwierzęta. W gruczołach jelita środkowego samic *X. nemoralis* z Olkusza dimetoat (P), stres łączony (T+P) oraz głodzenie (G) nie zmieniały odsetka komórek Hsp70 pozytywnych lub nieznacznie je obniżyły. Towarzyszył temu wzrost aktywności SOD, CAT i odsetka komórek Mt pozytywnych oraz niska aktywność GPOX i GSTPx. Może to wskazywać, że zastosowane czynniki stresowe działały hamująco na indukcję białek Hsp70, ale nie przeciwdziałały innym reakcjom chroniącym organizm przed nadmiarem reaktywnych form tlenu. Inaczej odpowiadały samice *A. labyrinthica* z tego stanowiska, gdyż, jak wykazano, czynniki stresogenne spowodowały u nich wzrost liczby komórek Hsp70 pozytywnych, szczególnie u osobników głodzonych lub poddanych działaniu stresu łączonego (T+P). Zmianom tym towarzyszyło podwyższenie aktywności proteazy kaspazopodobnej, nasilenie apoptozy i nekrozy, jak również obniżenie aktywności CAT, GPOX i GSTPx.

W przypadku samic *X. nemoralis* ze stanowiska referencyjnego zmiany odsetka komórek Hsp70 pozytywnych zarejestrowano tylko w gruczołach jelita środkowego osobników, które poddano szokowi termicznemu, a w przypadku *A. labyrinthica* u samic z grup T i G. Wzrostowi liczby komórek Hsp70 pozytywnych u samic pogońcowatych (*X. nemoralis*) z grupy T towarzyszyło nasilenie zmian apoptotycznych, a u głodzonych samic *A. labyrinthica* także nekrotycznych, przy podwyższonej aktywności CAT i zwiększonej syntezie metalotionein. Wyniki te dają podstawę do stwierdzenia, że białka Hsp70 pełnią ważną funkcję ochronną u samic

A. labyrinthica, ale ich synteza, przy braku innych, wspierających, reakcji antyoksydacyjnych może okazać się jednak niewystarczająca w utrzymaniu homeostazy komórkowej. W przypadku *X. nemoralis* zmiany poziomu Hsp70 były mniejsze niż u *A. labyrinthica*, ale towarzyszyło im nasilenie syntezy Mt i zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, co prawdopodobnie skutecznie chroniło komórki, nie dopuszczając do zaburzenia homeostazy, głównie w sytuacji braku pokarmu.

Reakcje samców na zastosowane w pracy stresory były bardziej jednoznaczne. Dla zwierząt obu gatunków z Pilicy był to wzrost odsetka komórek Hsp70 pozytywnych, niezależnie od rodzaju działającego czynnika. Było to również nasilenie apoptozy (głównie pająki głodzone), jak również nasilenie nekrozy (pająki zatrutowe dimetoatem i z grupy T+P). Ilościowe zależności pomiędzy komórkami wykazującymi cechy śmierci i odsetkiem komórek Hsp70 pozytywnych dotyczyły tylko samców *X. nemoralis* eksponowanych na szok termiczny.

W innych badaniach odpowiedzi zwierząt preekspozowanych i niepreekspozowanych na zanieczyszczenia również zależały od rodzaju analizowanego parametru. Badania KNIGGE i KÖHLER (2000) na dwóch populacjach Isopoda *P. scaber* (jedna z terenów zanieczyszczonych ołowiem, druga z terenu nieskażonego metalami), w których oceniano wskaźniki behawioralne i fizjologiczne (konsumpcja pokarmu, tempo respiracji, stężenie substratów energetycznych i białek stresu), po dodatkowej 80-dniowej ekspozycji w laboratorium na różne stężenia Pb wskazują, że stonogi z obu populacji zwiększały tempo respiracji i stężenie glikogenu. Efekty działania ołowiu były jednak silniejsze u osobników preekspozowanych. Okazało się ponadto, że synteza Hsp70 u stonóg z zanieczyszczonych stanowisk, odmiennie niż u osobników z populacji „czystych”, była słabsza przy niskich stężeniach ołowiu w pokarmie. Wynika z tego, że chroniczny kontakt z metalami wpływał hamująco na zdolność tych zwierząt do syntezy Hsp70 i był zależny od stężenia metalu i czasu ekspozycji (KNIGGE, KÖHLER, 2000). Podobny charakter zmian Hsp70 dotyczył również dwóch

gatunków skoczogonków: *Orchesella bifasciata* i *Tomocerus flavescens*, pochodzących z obszarów w gradiencie stężeń metali ciężkich (KÖHLER i in., 1999 a). Populacje *O. bifasciata* ze stanowiska umiarkowanie zanieczyszczonego miały o 40% więcej Hsp70 niż populacje ze stanowisk skrajnie zanieczyszczonych. Gdy osobniki z terenów silnie zanieczyszczonych i kontrolnych otrzymywały pokarm zawierający wysokie stężenie metalu, poziom białek stresu obniżał się, przy czym najniższe wartości osiągał u zwierząt kontrolnych, co mogło być przejawem uszkadzającego działania metalu na komórki. Udokumentowano, że w warunkach, gdy ekspozycja na stresor osiągnie poziom letalny, średnie tempo degradacji Hsp70 przekracza tempo ich syntezy, prowadząc do nieodwracalnego uszkodzenia błon komórkowych, wyczerpania się zapasów Hsp70 i wzrostu śmiertelności zwierząt (PAWERT i in., 1996). Takie efekty wykazano także u ślimaków *Deroceras reticulatum* (KÖHLER i in., 1996). Dlatego osobniki odporne na substancje chemiczne, zarówno z populacji z terenów silnie zanieczyszczonych, jak i kontrolnych, mogą być w większym stopniu niż osobniki z terenów średnio zanieczyszczonych narażone na stres spowodowany działaniem metali, nie są bowiem w stanie reagować przez wzrost syntezy Hsp70 adekwatnie do aktualnego zapotrzebowania.

Niski kontrolny odsetek komórek Mt pozytywnych w gruczołach jelita środkowego pajaków *X. nemoralis* z obu analizowanych stanowisk sugeruje, że stężenia metali stwierdzone w analizowanym narzędzie pogońcowatych nie indukowały syntezy tego typu białek. Pajaki *X. nemoralis* prawdopodobnie stosują strategię magazynowania metali w wewnątrzkomórkowych granulach. Można założyć, że deponowanie pierwiastków w formie nierozpuszczalnych konkrecji mineralnych jest w ich przypadku energetycznie oszczędniejsze od syntezy nowych cząsteczek metalotionein, których funkcja ochronna być może przejawia się dopiero podczas reakcji antyoksydacyjnych. Niemniej jednak istotnie wyższy odsetek komórek Mt pozytywnych u samic *A. labyrinthica* z terenów silnie zanieczyszczonych nie wyklucza, że u tego

gatunku metalotioneiny mogą być indukowane także w odpowiedzi na wysokie stężenie metali w komórkach.

Ekspozycja pajaków na czynniki stresogenne spowodowała nasilenie syntezy metalotionein w gruczołach jelita środkowego, przy czym wzrost liczby komórek Mt pozytywnych w poszczególnych grupach doświadczalnych, w stosunku do poziomu kontrolnego, zależał od gatunku i stanowiska. W przypadku *X. nemoralis* ze stanowiska w Pilicy, eksponowanych na dimetoat (P) i łączne działanie pestycydu oraz wysokiej temperatury (T+P), wykazano zwiększenie, w stosunku do uzyskanych wartości kontrolnych, odsetka komórek Mt pozytywnych. Podobne zmiany liczby komórek Mt pozytywnych stwierdzono w przypadku *A. labyrinthica* z Pilicy, lecz dotyczyło to wszystkich zastosowanych czynników stresogennych. Można przyjąć, że w odniesieniu do wymienionego parametru pajaki, które wcześniej nie były poddane chronicznemu działaniu metali ciężkich, cechuje większa wrażliwość na czynniki stresogenne, czego efektem było nasilenie, zależnie od rodzaju i siły stresora, reakcji obronnych związanych z syntezą Mt.

W pracach podkreśla się ochronną rolę metalotionein w stresie oksydacyjnym. Taką możliwość dokumentują m.in. badania na myszach traktowanych antymycyną i 2,4-dinitrofenolem (KONDOH i in., 2001). Wykazano u nich wzmożoną syntezę Mt w wątrobie, podczas gdy aktywność takich antyoksydantów, jak CAT czy Cu/Zn-SOD nie ulegała zmianie w wymienionym narzędzie. Ocena wzajemnych zależności między wielkością analizowanych parametrów antyoksydacyjnych i liczbą komórek Mt pozytywnych wskazuje, że w grupie T+P samic *X. nemoralis* z Olkusza liczba komórek Mt pozytywnych była dodatnio skorelowana z aktywnością CAT i SOD, lecz negatywnie z aktywnością GPOX. Podobne zależności, ale tylko w odniesieniu do SOD, wystąpiły w grupie P samic tego gatunku z Olkusza. Bardzo słabe zależności w odniesieniu do prezentowanych parametrów cechowały natomiast *A. labyrinthica*, u których niezależnie od płci tylko w przypadku pajaków grupy P z Pilicy wzrósł odsetek ko-

mórek Mt pozytywnych towarzyszyło zwiększenie stężenia glutationu. Uzyskane rezultaty sugerują, że w odpowiedziach antyoksydacyjnych pajaków mogą uczestniczyć także Mt, które współdziałają z innymi elementami systemu antyoksydacyjnego, w przypadku niesieciowego *X. nemoralis* z SOD i CAT, podczas gdy u pajaków tunelowych *A. labyrinthica* — z glutationem.

Metalotioneiny mogą aktywować drogi sygnalizacyjne wzmagające apoptozę w komórkach, zapobiegając w ten sposób przejściu uszkodzonych cząsteczek DNA do fazy S cyklu komórkowego (CAI i in., 1999; CAI, CHERIAN, 2003). Zgodnie z koncepcją BERNTSSENA i in. (2001), którzy badali, jak kadm wpływa na procesy apoptozy, proliferacji komórek i na produkcję metalotionein u łososa *Salmo salar*, regularne usuwanie uszkodzonych komórek jelita na drodze apoptozy jest możliwe dopiero po osiągnięciu maksymalnej indukcji Mt. Tym samym wzrasta tolerancja zwierząt na pokarm skażony kadmem. Jak wykazano w niniejszej pracy, wzrost liczby komórek Mt pozytywnych i komórek apoptotycznych lub wykazujących inne cechy wchodzenia komórek na drogę śmierci (np. zmiany aktywności proteazy kaspazopodobnej, wzrost odsetka komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami) dotyczył głównie samic *X. nemoralis*, niezależnie od stanowiska i rodzaju stresora. Zależności te u *A. labyrinthica* były słabiej zaznaczone i dotyczyły osobników z Pilicy z grup P, G i T+P. Nie można wykluczyć, że nasilenie zmian apoptotycznych i towarzyszący wzrost liczby komórek Mt pozytywnych w odpowiedzi na stres odzwierciedlał ochronną funkcję tych białek u przedstawicieli analizowanych gatunków pajaków. Także i w tym przypadku zwraca uwagę gatunkowo zróżnicowana wrażliwość na rodzaj zastosowanego czynnika i znaczenie faktu wcześniejszej preekspozycji na zanieczyszczenia.

5.5. Podsumowanie

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają odmienne reakcje na stres przedstawicieli dwóch behawioralnie i biologicznie zróżnicowanych gatunków pajaków. Różnice te uwidoczniły się zarówno w odniesieniu do komórkowych efektów działania stresorów (zmiany apoptotyczne i/lub nekrotyczne), jak i rodzaju uruchamianych reakcji antyoksydacyjnych (tab. 5.5 a, b).

Analizowane wskaźniki śmierci komórkowej w przypadku obu gatunków pajaków są dobrymi biomarkerami stresu ogólnego wywołanego ekspozycją zarówno na czynniki naturalne, jak i antropogeniczne. Wynika to z braku jednoznacznych zależności między ilościowymi zmianami mierzonych parametrów a rodzajem oddziałujących stresorów. Dlatego na podstawie wartości oznaczanych parametrów nie można precyzyjnie różnicować przyczyn zaistniałych zmian, lecz jedynie potwierdzić istnienie stresu, który w zależności od stopnia nasilenia czynników stresowych wzmagał procesy apoptotyczne i/lub nekrotyczne. Analiza stosunków ilościowych tego typu parametrów umożliwia porównywanie wrażliwości gatunków na zastosowane czynniki stresogenne.

Uzyskane rezultaty potwierdziły wykazane we wcześniejszych badaniach gatunkowe zróżnicowanie odnośnie do rodzaju uruchamianych reakcji antyoksydacyjnych u pajaków. Niezależnie od rodzaju działającego czynnika stresogennego w przypadku *X. nemoralis* ważną funkcję ochronną w gruczołach jelita środkowego spełnia SOD i CAT, a u *A. labyrinthica* są to GSH i białka Hsp70. Ilościowe zmiany komórek Mt pozytywnych w poszczególnych grupach doświadczalnych mogą wskazywać, że rola metalotionein u pajaków w większym stopniu dotyczy ochrony antyoksydacyjnej niż bezpośredniego wiązania metali.

Tabela 5.5

Kierunki stwierdzonych zmian ilościowych analizowanych parametrów w gruczołach jelita środkowego pajaków z poszczególnych grup eksperymentalnych: a) *A. labyrinthica*, b) *X. nemoralis*

a)

Parametr	Stanowisko															
	Pilica			Olkusz				Pilica				Olkusz				
	Grupa															
	Samice								Samce							
	T	P	T+P	G	T	P	T+P	G	T	P	T+P	G	T	P	T+P	G
Wskaźniki śmierci komórkowej																
$\Delta\Psi_m$																
Cas-3																
Apoptoza [%]																
Nekroza [%]																
Białka stresu																
Mt																
Hsp70																
Parametry antyoksydacyjne																
GSH + GSSG																
GPOX																
GSTPx																
GST																
SOD																
CAT																

b)

Wskaźniki śmierci komórkowej																
$\Delta\Psi_m$																
Cas-3																
Apoptoza [%]																
Nekroza [%]																
Białka stresu																
Mt																
Hsp70																
Parametry antyoksydacyjne																
GSH + GSSG																
GPOX																
GSTPx																
GST																
SOD																
CAT																

Objaśnienia: Kolor brązowy — wartości parametru istotnie wyższe od wartości kontrolnych; kolor niebieski — wartości parametru istotnie niższe od wartości kontrolnych; brak wypełnienia — nie stwierdzono różnic istotnych w odniesieniu do wartości kontrolnych. K — kontrola (A, F), T — szok termiczny (B, G), P — pestycyd (C, H), T+P — szok termiczny i pestycyd, (D, I), G — głodzenie (E, J).

6. Wnioski

1. Spośród zastosowanych stresorów u obu gatunków pajaków największe zmiany oceniane wielkością odsetka komórek apoptotycznych w gruczołach jelita środkowego powodowało głodzenie. Proapoptotyczny efekt działania zastosowanych czynników stresogennych zmniejszał się w następującym porządku: głodzenie > szok termiczny + dimetoat > dimetoat > szok termiczny.
2. W grupach eksponowanych na szok termiczny i/lub dimetoat stopień zmian nekrotycznych w analizowanym narządzie *Xerolycosa nemoralis* był większy niż w analogicznych grupach *Agelena labyrinthica*. Sugeruje to większą wrażliwość gatunku niesieciowego na wymienione czynniki stresowe. Z kolei głodzenie nie wpływało istotnie na wystąpienie zmian nekrotycznych w komórkach gruczołów jelita środkowego *Xerolycosa nemoralis*, co sugeruje, że przedstawiciele tego gatunku cechuje znaczna tolerancja na okresy niedoboru pokarmu.
3. Enzymatyczne reakcje neutralizujące reaktywne formy tlenu w przypadku samic *X. nemoralis* opierały się głównie na aktywności SOD i CAT, natomiast w odpowiedzi na czynniki stresowe u samców wzrosła zarówno aktywność SOD i CAT, jak i stężenie glutationu oraz aktywność enzymów związanych z jego metabolizmem. Odpowiedzi antyoksydacyjne rejestrowane w gruczołach jelita środkowego *A. labyrinthica* były słabo zróżnicowane i dotyczyły głównie wzrostu stężenia glutationu oraz, w zależności od płci, aktywności GPOX (samice i samce) lub GSTPx (samce).
4. Odpowiedzią na czynniki stresowe u pajaków była indukcja syntezy białek stresu. Samice *X. nemoralis* cechowała zwiększona synteza Mt, podczas gdy samce w podobnych warunkach wykazywały wzrost produkcji Hsp70. U samic *A. labyrinthica* czynniki stresowe stymulowały syntezę Hsp70, a u samców — Hsp70 i Mt. Dodatkowo korelacje, jakie stwierdzono między liczbą komórek Hsp70 i/lub Mt pozytywnych oraz liczbą komórek apoptotycznych i liczbą komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami, mogą wskazywać na antyapoptotyczną funkcję wymienionych białek.
5. Osobniki z terenów silnie zanieczyszczonych są bardziej wrażliwe na stosowane czynniki stresowe niż te, które nie były wcześniej eksponowane na zanieczyszczenia. Odmienność odpowiedzi komórkowych samic i samców pajaków z terenów o różnym stopniu zanieczyszczenia potwierdza konieczność uwzględniania w tego typu badaniach czynnika płci, traktowanie bowiem wszystkich osobników łącznie może nie ujawniać powiązań ilościowych między poziomem analizowanych parametrów w aspekcie długotrwałej preekspozycji pajaków na zanieczyszczenia:
 - a. Samice *X. nemoralis* pochodzące z Olkusza w porównaniu z samcami (za wyjątkiem grupy głodzonej) przejawiały nasile-

nie procesów nekrotycznych z towarzyszącymi zmianami aktywności proteazy kaspazopodobnej i zwiększeniem odsetka komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami. Efektem głodzenia samic było wyłącznie zwiększenie liczby komórek apoptotycznych. Preekspozowane na zanieczyszczenia samice *X. nemoralis* cechowała wyższa aktywność SOD i CAT niż osobniki z terenu referencyjnego, niezależnie od rodzaju działających dodatkowych czynników stresogennych.

Wysoki odsetek komórek apoptotycznych stwierdzony u samców ze stanowiska w Olkuszu dotyczył pajaków z grup poddanych łącznemu działaniu wysokiej temperatury i pestycydu oraz głodzeniu, gdy tymczasem u osobników tej płci z Pilicy nasilały się zmiany nekrotyczne w grupach: głodzonej oraz poddanych działaniu temperatury i/lub pestycydu. Zmiany reakcji antyoksydacyjnych u samców polegały na wzroście aktywności CAT i GSTPx.

- b. Nasilenie zmian nekrotycznych i apoptotycznych cechowało zarówno samice, jak

i samce *A. labyrinthica* niezależnie od stopnia zanieczyszczenia stanowisk badawczych głównie w odpowiedzi na głodzenie. Zastosowanie dimetoatu i stresu łączonego ujawniło zwiększenie nekrozy i/lub apoptozy głównie u osobników z Olkusza. Reakcje antyoksydacyjne nasilały się bardziej u pajaków ze stanowiska w Olkuszu, lecz dotyczyły tylko takich parametrów, jak GSH + GSSG i GPOX.

6. W przypadku reprezentanta pogońcowatych (*X. nemoralis*) o cytoprotekcyjnej funkcji SOD i CAT świadczą dodatnie korelacje, jakie udokumentowano między ich aktywnością i stopniem nasilenia nekrozy i/lub apoptozy w analizowanym narządzie. Jeśli chodzi o pajaki tunelowe (*A. labyrinthica*), to oba parametry były skorelowane ujemnie lub brak było takich zależności. Cytoprotekcyjną funkcję u *A. labyrinthica* spełniają białka Hsp70, gdyż odsetek komórek ginących na drodze nekrozy był niższy w grupach doświadczalnych, dla których wykazano wyższy odsetek komórek Hsp70 pozytywnych.

Bibliografia

- ABDEL-MAGEED A., AGRAWAL K.C., 1997. Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.*, **4**: 199—207.
- ADAMS M., SAVINO E., FREEMAN M., 1994. Timing and induction of hsp70 production in *Clamydomonas reinhardtii*. *Biologia (Bratislava)*, **49**: 623—628.
- AHMAD S., BEILSTEIN M.A., PARDINI R.S., 1989. Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **12**: 31—49.
- AHMAD S., PARDINI R.S., 1990. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Rad. Biol. Med.*, **8**: 401—413.
- AHMAD S., 1995. Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **29**: 135—157.
- ALBERTI G., STORCH V., 1983. Zur Ultrastruktur der Mitteldarmdrüsen von Spinnentieren (Scoorpio-nes, Araneae, Acari) unter verschiedenen Ernährungsbedingungen. *Zool. Anz.*, **211**: 145—160.
- ALLEN R.G., FARMER R.K., NEWTON R.K., SOHAL R.S., 1984. Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in adult housefly. *Comp. Biochem. Physiol.*, **78C**: 283—288.
- AMALIN D.M., PENA J.E., YU S.J., MCSORLEY R., 2000. Selective toxicity of some pesticides to *Hibana velox* (Araneae: Anyphaenidae), a predator of citrus leafminer. *The Florida Entomologist*, **83**: 254—262.
- ANDERSON J.F., 1970. Metabolic rates of spiders. *Comp. Biochem. Physiol.*, **33**: 51—72.
- ANDERSON J.F., 1974: Responses to starvation in the spiders *Lycosa lenta* (HENTZ) and *Filistata hibernalis* (HENTZ). *Ecology*, **55**: 576—585.
- ANDREWS S.M., JOHNSON M.S., COOKE J.A., 1989. Distribution of trace element pollutants in a contaminated grassland ecosystem established metal-liferous fluorspar tailings 1: Lead. *Environ. Pollut.*, **58**: 73—85.
- ANGELIDIS C.E., LAZARIDIS I., PAGOULATOS G.N., 1991. Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur. J. Biochem.*, **199**: 35—39.
- ANSALDO M., SACRISTAN H., WIDER A., 2007. Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? *Comp. Biochem. Physiol.*, **146C**: 118—123.
- ARDEN N., BETENBAUGH M.J., 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.*, **22**: 174—180.
- ARTS M.J., SCHILL R.O., KNIGGE T., ECKWERT H., KAMMENG J.E., KÖHLER H.-R., 2004. Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematods by field exposure to metal in a gradient near Avonmouth, UK. *Ecotoxicology*, **13**: 739—755.
- AUGUSTYNIAK M., MIGULA P., 2000. Body burden with metals and detoxifying abilities of the grasshopper-*Chorthippus brunneus* (Thunberg) from industrially polluted areas. W: Trace metals in the environment. Eds. MARKERT B., FRIEZE K. Amsterdam: Elsevier, pp. 423—454.
- AUGUSTYNIAK M., BABCZYŃSKA A., MIGULA P., WILCZEK G., ŁASZCZYCA P., 2005. Joint effects of dimethoate and heavy metals on metabolic responses in a grasshopper (*Chorthippus brunneus*)

- from a heavy metals pollution gradient. *Comp. Biochem. Physiol.*, **141C**: 412—419.
- BABCZYŃSKA A., MIGULA P., 2002. Cadmium — fenitrothion interaction in spider *Pardosa lugubris* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **69**: 589—592.
- BABCZYŃSKA A., WILCZEK G., MIGULA P., 2006. Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.*, **370**: 352—359.
- BARTOSZ G., 1995. *Druga twarz tlenu*. Warszawa: PWN.
- BEBBIANO M.J., LANGSTON W.J., SIMKISS K., 1992. Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca, Prosobranchia) on exposure to cadmium. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, **72**: 329—342.
- BEERE H.M., GREEN D.R., 2001. Stress management — heat shock protein — 70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **11**: 6—10.
- BERGER B., DALLINGER R., THOMASER A., 1995. Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**: 781—791.
- BERNTSEN M.H.G., ASPHOLM O., HYLLAND K., WENDELAAR BONGA S.E., LUNDEBYE A.-K., 2001. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, **128C**: 299—310.
- BIELAK-ŻMIJEWSKA A., 2003. Mechanizmy odporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos*, **2—3**: 157—171.
- BLANCO G.A., BUSTAMANTE J., GARCIA M., HAJOS S.E., 2005. Hydrogen peroxide induces apoptotic-like cell death in coelomocytes of *Themiste petricola* (Sipuncula). *Biol. Bull.*, **209**: 168—183.
- BÖHM I., SCHILD H., 2003. Apoptosis: The complex scenario for a silent cell death. *Molecular Imaging and Biology*, **5**: 2—14.
- BOISSY R.E., MANGA P., 2004. On the ethiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Res.*, **17**: 208—214.
- BONNARIC J.C., DE REGGI M., 1977. Changes in ecdysone levels in the spider *Pisaura mirabilis* nymphs (Araneae: Pisauridae). *Experientia*, **33**: 1664—1665.
- BORRAS C., SASTRE J., GARCIA-SALA D., LLORET A., PALLARDO F.V., VINA J., 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**: 546—552.
- BORUTAITE V., BROWN G.C., 2001. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. *FEBS Lett.*, **500**: 114—118.
- BORUTAITE V., BROWN G.C., 2003. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett.*, **541**: 1—5.
- BOSSY-WETZEL E., GREEN D.R., 1999. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res.*, **434**: 243—251.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analyt. Biochem.*, **72**: 248—254.
- BROWN B.E., 1982. The form and function of metal containing 'granules' in invertebrate. *Biol. Rev.*, **57**: 621—667.
- CAI L., SATOH M., TOHYAMA, CHERIAN M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*, **132**: 85—98.
- CAI L., CHERIAN M.G., 2003. Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper- or cadmium-metallothioneins. *Toxicol. Lett.*, **136**: 193—198.
- CARPENTER C.M., HOFMANN G.E., 2000. Expression of 70kda heat shock proteins in antarctic and New Zeland notothenioid fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **125C**: 229—238.
- CARRANZA A., MENDEZ C., BARONTINI F., NOWICKI S., 2004. Insulin enhances l-dopa renal proximal tubule uptake: a regulatory mechanism impaired in insulin resistance. *Pflügers Archiv-Eur. J. Physiol.*, **448**: 85—92.
- CARY T.L., CHANDLER G.T., VOLZ D.C., WALSE S.S., FERRY J.L., 2004. Fipronil induces male infertility in the meiobenthic harpacticoid copepod, *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Sci. Technol.*, **39**: 522—528.
- CASCO V.H., IZAGUIRRE M.F., MARIN L., VERGARA M.N., LAJMANOVICH R.C., PELTZER P., PERALTA SOLER A., 2006. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cell Biol. Toxicol.*, **22**: 199—211.
- CASINI S., FOSSI M.C., LEONZIO C., RENZONI A., 2003. Review: Porphyrins as biomarkers of hazard assessment of bird populations: destructive and non-destructive use. *Ecotoxicology*, **12**: 297—303.
- CASTEDO M., MACHO A., ZAMZAMI N., HIRSCH T., MARCHETTI P., URIEL J., KROEMER G., 1995. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, **25**: 3277—3284.

- CHABICOVSKY M., WASTL U., TAPER H., GRASL-KRAUPP B., SCHULTE-HERMANN R., BURSCH W., 2003. Induction of apoptosis in mouse liver adenoma and carcinoma *in vivo* by transforming growth factor- β 1. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**: 536—542.
- CHABICOVSKY M., KLEPAL W., DALLINGER R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 648—655.
- CHANDRA J., SAMALI A., ORRENIUS S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**: 323—333.
- CHEN J.Q., YAGER J.D., 2004. Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogens carcinogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1028**: 258—272.
- CHEN J., GOKHALE M., SCHOFIELD B., ODWIN S., YAGER J.D., 2000. Inhibition of TGF-beta-induced apoptosis by ethinyl estradiol in cultured, precision cut rat liver slices and hepatocytes. *Carcinogenesis*, **21**: 1205—1211.
- CHERKASOV A.S., GREWAL S., SOKOLOVA I., 2007. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Therm. Biol.*, **32**: 162—170.
- CHOI S.S., RHEE W.J., PARK T.H., 2002. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. *Biotechnol. Prog.*, **18**: 874—878.
- CHUKHLOVIN A.B., TOKALOV S.V., YAGUNOV A.S., WESTENDORF J., REINCKE H., KARBE L., 2001. *In vitro* suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. *Sci. Total Environ.*, **281**: 153—163.
- CIKALA M., WILM B., HOBMAYER E., BÖTTGER A., DAVID Ch.N., 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Current Biology*, **9**: 959—962.
- CLAUSEN J.H.S., 1984a. Lead (Pb) in spiders: A possible measure of atmospheric Pb pollution. *Environ. Pollut.*, **8**: 217—230.
- CLAUSEN J.H.S., 1984b. Notes on the impact of air pollution (SO₂ & Pb) on spiders (Araneae) populations in North Zealand, Denmark. *Entomol. Meddr.*, **52**: 33—39.
- CLAUSEN J.H.S., 1986. The use of spiders (Araneae) as ecological indicators. *Bull. Br. Arachnol. Soc.*, **3**: 83—86.
- CLAUSEN J.H.S., 1991. Analysis of the dynamics of Cd, Pb and Al in a media — *Drosophila* (Diptera) — *Steatoda* (Araneae) food chain. Univ. Copenhagen (manuscript).
- CLAYTON M.E., STEIMANN R., FENT K., 2000. Different expression patterns of heat shock proteins HSP60 and HSP70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat. Toxicol.*, **47**: 213—226.
- COELHO D., HOLL V., VELTIN D., LACORNERIE T., MAGNET P., DUFOUR P., BISCHOFF P., 2000. Caspase-3 like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells. *Br. J. Cancer*, **83**: 642—649.
- COLLATZ K.G., MOMMSEN T., 1975. Veränderung der Körperzusammensetzung und der Stoffwechselintensität der Spinne *Tegenaria atrica* C.L. Koch (Agelenidae) nach kurzem und langem Hunger. *J. Comp. Physiol.*, **98**: 205—212.
- COLLATZ K.-G., 1987: Structure and function of the digestive tract. W: *Ecophysiology of spiders*. Ed. NENTWIG W. Berlin—Heidelberg: Springer Verlag, pp. 229—238.
- CREAGH E.M., CARMODY R.J., COTTER T.G., 2000. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res.*, **257**: 58—66.
- CRUZ-RODRIGUEZ L.A., CHU F.L.E., 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.*, **60**: 157—168.
- CURTIN J.F., DONOVAN M., COTTER T.G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Imm. Meth.*, **265**: 49—72.
- DABRIO M., RODRIGUEZ A.R., BORDIN G., BEBBIANO M.J., LEY M., SESTAKOVA I., VASAK M., NORDBERG M., 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, **88**: 123—134.
- DAFRE A.L., MEDEIROS I.D., MULLER I.C., VENTURA E.C., BAINY A.C.D., 2004. Antioxidant enzymes and thio/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chem. Biol. Interact.*, **149**: 97—105.
- DAISH T.J., MILLS K., KUMAR S., 2004. *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev. Cell*, **7**: 909—915.

- DALLINGER R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. W: Ecotoxicology of metals in invertebrates. Eds. DALLINGER R., RAINBOW P.S. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 245—280.
- DALLINGER R., RAINBOW P.S., 1993. Ecotoxicology of metals in invertebrates. Lewis Publishers.
- DALLINGER R., BERGER B., GRUBER C., HUNZIKER P., STÜRZENBAUM S., 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cell Mol. Biol.*, **46**: 331—346.
- DABROWSKA-PROT E., 1984. The effect of industry on biocenoses. *Pol. Ecol. Stud.*, **10**: 187—205.
- DEELEMEN-REINHOLD C.L., 1990. Changes in the spider fauna over 14 years in an industrially polluted area in Holland. *Acta Zool. Fenn.*, **190**: 103—110.
- DEN BESTEN P.J., ELENBAAS J.M.L., MAAS J.R., DIELEMAN S.J., HERWIG H.J., VOOGT P.A., 1991. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L. *Aquat. Toxicol.*, **20**: 95—110.
- DENECKER G., VERCAMMEN D., DECLERCQ W., VANDE NABEELE P., 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol. Life Sci.*, **58**: 356—370.
- DEPLEDGE M.H., FOSSI M.C., 1994. The potential use of invertebrate biomarkers in ecological risk assessment. *Ecotoxicology*, **3**: 161—172.
- DESAGHER S., MARTINOU J.-C., 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **10**: 369—377.
- DHAHBI J.M., CAO S.X., MOTE P.L., ROWLEY B.C., WINGO J.E., SPINDER S.R., 2002. Postprandial induction of chaperone gene expression is rapid in mice. *J. Nutr.*, **132**: 31—37.
- DHAHBI J.M., MOTE P.L., YILMAN J.B., WANFORD R.L., SPOINDER S.R., 1997. Dietary energy tissue-specifically regulates endoplasmic reticulum chaperone gene expression in the liver of mice. *J. Nutr.*, **127**: 1758—1764.
- DOWNS C.A., DILLON R.T., FAUTH J.E., WOODLEY C.M., 2001. A molecular biomarker system for assessing the health of gastropod (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **259**: 189—214.
- DOYOTTE A., COSSU C., JACQUIN M.-C., BABUT M., VASSEUR P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.*, **39**: 93—110.
- DURMAZ H., YUSUF S., NEVIN U., 2006. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.*, **84**: 215—226.
- EASON C., O'HALLORAN K., 2002. Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology*, **181—182**: 517—521.
- ECKWERT H., ZANGER M., REISS S., MUSOLFF H., ALBERTI G., KÖHLER H.-R., 1994. The effect of the heavy metals on the expression of hsp70 in soil invertebrates. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, **87**: 325.
- ECKWERT H., ALBERTI G., KÖHLER H.-R., 1997. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology*, **6**: 249—262.
- ECKWERT H., KÖHLER H.-R., 1997. The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (Isopoda) field populations: variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites. *Appl. Soil Ecol.*, **6**: 275—282.
- EDGAR W.D., 1970. Prey and feeding behaviour of adult females of the wolf spider *Pardosa amentata* (CLERCK). *Neth. J. Zool.*, **20**: 487—491.
- EISLER H., FROHLICH K.U., HEIDENREICH E., 2004. Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp. Cell Res.*, **300**: 345—353.
- ELLGAARD L., MOLINARI M., HELENIUS A., 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**: 1882—1887.
- ELMES M.E., 1977. Apoptosis in the small intestine of zinc deficient and fasted rats. *J. Pathol.*, **123**: 219—223.
- ERNST W.H.O., 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. W: Ecotoxicology: ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects. Eds. SCHURRMAN G., MARKERT B. New York: John Wiley & Sons, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 587—620.
- ESPINOZA-NAVARRO O., BUSTOS-OBREGON E., 2004. Sublethal doses of malathion alter male reproductive parameters of *Eisenia foetida*. *Int. J. Morphol.*, **22**: 297—302.

- FERNANDEZ-CHECA J.C., 2003. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **304**: 471—479.
- FIGUEIREDO-FERNANDES A., FONTAINHAS-FERNANDES A., PEIXOTO F., ROCHA E., REIS-HENRIQUES M.A., 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **85**: 97—103.
- FOELIX F.R., 1996. *Biology of spiders*. New York: Oxford University Press, Georg Thieme Verlag.
- GALLI T., ZAHRAOUI A., VAIDYANATHAN V.V., RAPOSO G., TIAN J.M., KARIN M., NIEMANN H., 1998. A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, **9**: 1437—1448.
- GALLOIS P., MAKISHIMA T., HECHTT V., DESPRES B., LAUDIE M., NISHIMOTO T., COOKIE R., 1997. An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. *Plant J.*, **11**: 1325—1331.
- GARCIA S.L., MELLO M.L.S., RODRIGUES V.L.C., GARCIA N.L., 2000. Nuclear Phenotype Changes after Heat Shock in *Panstrongylus megistus* (BURMEISTER). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **95**: 271—277.
- GARDNER A.M., XU F.-H., FADY C., JAKOBY F.J., DUFFY D.C., TU Y., LIGHTENSTEIN A., 1997. Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.*, **22**: 73—83.
- GEHARDT F., ZANKER K.S., BRANDT B., 1999. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron. *J. Biol. Chem.*, **274**: 13176—13180.
- GORMAN A.M., HEAVEY B., CREAGH E., COTTER T.G., SAMALI A., 1999. Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett.*, **445**: 98—102.
- GREENSTONE M.H., 1979. Spider behavior optimizes dietary essential amino acid composition. *Nature*, **282**: 501—503.
- GREENSTONE M.H., BENNETT A.F., 1980. Foraging strategy and metabolic rate in spiders. *Ecology*, **61**: 1255—1259.
- GUDERLEY H., LAPOINTE D., BEDARD M., DUTIL J.M., 2003. Metabolic prioritets during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **135A**: 347—356.
- GUNNARSSON B., JOHNSON J., 1989. Effects of simulated acid rain on growth rate in a spruce-living spiders. *Environ. Pollut.*, **56**: 311—317.
- GUPTA S., 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.*, **69**: 2957—2964.
- HABEEBU S.S.M., LIU J., KLAASSEN C.D., 1998. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **149**: 203—209.
- HALLANDER H., 1970. Prey, cannibalism and microhabitat selection in the wolf spiders *Pardosa chelata* O.F. MULLER and *P. pullata* CLERCK. *Oikos*, **21**: 337—340.
- HAMER B., HAMER D.P., MÜLLER W.E.G., BATEL R., 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environ. Int.*, **30**: 873—882.
- HAMERS T., KROGH P.H., 1997. Predator-prey relationships in a two-species toxicity test system. *Ecotox. Environ. Safety*, **37**: 203—212.
- HAMPTON M.B., ORRENIUS S., 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.*, **414**: 552—556.
- HAMPTON M.B., STAMENKOVIC I., WINTERBOURN C.C., 2002. Interaction with substrate sensitises caspase-3 to inactivation by hydrogen peroxide. *FEBS Lett.*, **517**: 229—232.
- HART B.A., VOSS G.W., SHATOS M.A., DOHERTY J., 1990. Cross-tolerance to hyperoxia following cadmium aerosol pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **103**: 255—270.
- HARTL F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**: 571—580.
- HE L., FOX M.H., 1997. Variation of heat shock protein 70 through the cell cycle in HL-60 cells and its relationship to apoptosis. *Exp. Cell Res.*, **232**: 64—71.
- HELMBRECHT K., ZEISE E., RENSING L., 2000. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.*, **33**: 341—365.
- HENDRICKX F., MAELFAIT J.-P., LANGENBICK F., 2003. Absence of cadmium excretion and high assimilation result in cadmium biomagnification in a wolf spider. *Ecotox. Environ. Safety*, **55**: 287—292.
- HENSBERGEN P.J., VAN VELZEN M.J.M., NUGROHO R.A., DONKER M.H., VAN STRAALEN N.M., 2000. Metallothionein-bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, **125C**: 17—24.
- HERCEG Z., WANG Z.Q., 2001. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair,

- genomic integrity and cell death. *Mutat Res.*, **477**: 97—110.
- HERMES-LIMA M., STOREY K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.*, **268**: R1386—R1393.
- HIRSCH T., MARZO I., KROEMER G., 1997. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci. Rep.*, **17**: 67—76.
- HOF A., HEIMANN D., RÖMBKE J., 1995. Further development for testing the effects of pesticides on wolf spiders. *Ecotox. Environ. Safety*, **31**: 264—270.
- HONG J.X., LEE F.J., PATTON W.A., LIN C.Y., MOSS J., VAUGHAN M., 1998. Phospholipid- and GTP-dependent activation of cholera toxin and phospholipase D by human ADP-ribosylation factor-like protein 1 (HARL1). *J. Biol. Chem.*, **273**: 15872—15876.
- HOPKIN S.P., 1986. Ecophysiological strategies of terrestrial arthropods for surviving heavy metal pollution. *Proc. 3rd European Congress Entomol.*, Amsterdam, 24—29 Aug. 1986, pp. 263—266.
- HOPKIN S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. London: Elsevier Applied Science.
- HOSSETTI B.B., FROST S., 1993. Catalase activity in wastewater. *Wat. Res.*, **28**: 497—500.
- HUNTER B.A., JOHNSON M.S., THOMPSON D.J., 1987. Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. *J. Appl. Ecol.*, **24**: 587—599.
- ISZARD M.B., LIU J., KLAASSEN C.D., 1995. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology*, **104**: 25—33.
- JÄÄTTELÄ M., 1999. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell. Res.*, **248**: 30—43.
- JACOBSON M.D., 1996. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.*, **21**: 83—86.
- JAGERS OP AKKERHUIS G.A.J.M., ROSSING W.A.H., PIET G., EVERTS J.W., 1997. Water depletion, an important cause of mortality in females of the spider *Oedotiorax apicatus* after treatment with deltamethrin: a simulation study. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **58**: 63—76.
- JANG G., PARK E.S., CHO J.K., BHUIYAN M.M., LEE B.C., KANG S.K., HWANG W.S., 2004. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. *Theriogenology*, **62**: 512—521.
- Ji L.L., LEEUWENBURGH C., 1996. Glutathione and exercise. W: *Pharmacology in exercise and sport*. Ed. SOMANI S.M. New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc. Boca Raton, pp. 97—120.
- JOYNER-MATOS J., DOWNS C.A., JULIAN D., 2006. Increased expression of stress proteins in the surf clam *Donax variabilis* following hydrogen sulphide exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, **145A**: 245—257.
- KAGI J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. W: *Methods in Enzymology*. Eds. RIORDAN J., VALLEE B. San Diego: Academic Press, **205**: 613—626.
- KAMMENG J.E., DALLINGER R., DONKER M.H., KÖHLER H.-R., SIMONSEN V., TRIEBSKORN R., WEEKS J.M., 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **164**: 93—147.
- KANG Y.J., 1997. Alteration of antioxidant system. W: *Handbook of human toxicology*. Ed. MASARO E. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, pp. 275—284.
- KARIN M., ANDERSEN R.D., HERSCHMAN H.R., 1981. Induction of metallothionein mRNA in HeLa cells by dexamethasone and by heavy metals. *Eur. J. Biochem.*, **118**: 527—531.
- KARLIN S., BROCCIERI L., 1998. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J. Mol. Evol.*, **47**: 565—577.
- KAROUNA-RENIER N.K., ZEHR J.P., 2003. Cloning and characterization of a 70 kDa heat shock cognate gene (HSC70) from two species of *Chironomus*. *Insect. Molec. Biol.*, **12**: 19—26.
- KHALIL M.A., DONKER M.H., STRAALEN N.M., 1995. Long-term and short-term changes in the energy budget of *Porcellio scaber* Latreille (Crustacea) exposed to cadmium polluted food. *Eur. J. Soil Biol.*, **31**: 163—172.
- KIESSLICH T., PLAETZER K., OBERDANNER Ch.B., BERLANDA J., OBERMAIR F.J., KRAMMER B., 2005. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction. *FEBS Lett.*, **579**: 185—190.
- KLOSTERHAUS S.L., DiPINTO L.M., CHANDLER G.T., 2003. A comparative assessment of Azinphosmethyl bioaccumulation and toxicity in two estuarine meiobenthic harpacticoid copepods. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**: 2960—2968.

- KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., 2002. Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych. Warszawa: PWN.
- KNIGGE T., KÖHLER H.-R., 2000. Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environ. Pollut.*, **108**: 209—217.
- KNUTTI R., BUCHER P., STENGL M., STOLZ M., TREMP J., ULRICH M., SCHLATTER C., 1988. Cadmium in the invertebrate fauna of an unpolluted forest in Switzerland. *Environ. Tox. Ser.*, **2**: 171—191.
- KÖHLER H.-R., RAHMAN B., GRÄFF S., BERKUS M., TRIEBSKORN R., 1996. Expression of the stress 70-protein family (hsp70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: an approach to monitor sublethal stress conditions. *Chemosphere*, **33**: 1327—1340.
- KÖHLER H.-R., ECKWERT H., TRIEBSKORN R., BENGTSSON G., 1999 a. Interaction between tolerance and 70 kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl. Soil Ecol.*, **11**: 43—52.
- KÖHLER H.-R., KNÖDLER C., ZANGER M., 1999 b. Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B(a)P, PCB52, (-HCH, PCP): suitability and limits of a biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **36**: 179—185.
- KÖHLER H.-R., ZANGER M., ECKWERT H., EINFELDT I., 2000. Selection favours low hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.*, **13**: 569—582.
- KOLENKO V., BLOOM T., RAYMAN P., BUKOWSKI R., HIS E., FINKE J., 1999. Inhibition of NF-kappa B activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase-1 and -3. *J. Immunol.*, **163**: 590—598.
- KONDO Y., RUSNAK J.M., HOYT D.G., SETTINERI C.E., PITT B.R., LAZO J.S., 1997. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol. Pharmacol.*, **52**: 195—201.
- KONDOH M., INOUE Y., ATAGI S., FUTAKAWA N., HIGASHIMOTO M., SATO M., 2001. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci.*, **69**: 2137—2146.
- KORSLOOT A., 2002. An analysis of the interdependence and co-ordination of cellular stress defense systems in arthropods. Thesis 2002—2008 of the Institute of Ecological Science. Amsterdam: Vrije Universiteit.
- KRAMARZ P., 2000. Cadmium and zinc accumulation and its demographic effects in invertebrates. W: *Demography in ecotoxicology*. Eds. KAMMENG J., LASKOWSKI R. New York: J. Wiley & Sons Ltd, pp. 91—111.
- KREGEL K.C., 2002. Molecular biology of thermoregulation: invited review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, **92**: 2177—2186.
- KROEMER G., 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**: 433—435.
- KURANAGO E., MIURA M., 2007. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.*, **17**: 135—144.
- KURTZ J., SAUER K.P., 2001. Gender differences in phenoloxidase activity of *Panorpa vulgaris* hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, **78**: 53—55.
- LAGADIC L., 1999. Biomarkers in invertebrates. Evaluating the effects of chemicals on populations and communities from biochemical and physiological changes of individuals. W: *Biomarkers: a pragmatic basis for remediation of severe pollution in Eastern Europe*. Eds. PEAKALL D.B., WALKER C.H., MIGULA P. London: Kluwer Academic Publishers, pp. 153—175.
- LARSEN K.J., BREWER S.R., TAYLOR D.H., 1994. Differential accumulation of heavy metals by web spiders and ground spiders in an-old field. *Comp. Biochem. Physiol.*, **13**: 503—508.
- LASKOWSKI R., MARYAŃSKI M., PYZA E., WOJTUSIAK J., 1996. Sublethal toxicity tests for long-lived iteroparous invertebrates: searching for a solution. W: *Bioindicator systems for soil pollution*. Eds. VAN STRAALEN N.M., KRIVOLUTSKY D.A. London: Kluwer Academic Publishers, pp. 45—53.
- LASKOWSKI R., MIGULA P., 2004. *Ekotoksykologia od komórki do systemu*. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
- LE GOFF G., HILLIOU F., SIEGFRIED B.D., BOUNDY S., WAINBERG E., SOFER L., AUDANT P., CONSTANT R.-H., FERREYSEN R., 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **36**: 674—682.
- LECOEUR H., LANGONNE A., BAUX L., REBOUILLAT D., RUSTIN P., 2004. Real-time flow cytometry analy-

- sis of permeability transition in isolated mitochondria. *Exp. Cell Res.*, **294**: 106—117.
- LEE K.S., CHENG-YU, BAEHRECKE E.H., 2000. Genetic regulation of programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Research*, **10**: 193—204.
- LEE K.S., CHUNG E.H., HAN J.H., SOHN H.D., JIN B.R., 2003. cDNA cloning of a defender against apoptotic cell death 1 (DAD1) homologue, responsive to external temperature stimulus from the spider, *Araneus ventricosus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **135B**: 117—123.
- LEE M.Y., HUEBERS H., MARTIN A.W., FINCH C.A., 1978. Iron metabolism in a spider, *Dugesia hentsi*. *J. Comp. Physiol.*, **127**: 349—354.
- LEIST M., CASTOLDI A.F., KÜHNLE S., NICOTERA P., 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, **21**: 1481—1486.
- LEIST M., SINGLE B., NAUMANN H., FAVA E., SIMON B., KÜHNLE S., NICOTERA P., 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp. Cell Res.*, **249**: 396—403.
- LEIST M., JAATTELA M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**: 589—598.
- LENGWEHASATIT I., DICKSON A.J., 2002. Analysis of the role of GADD153 in the control of apoptosis in NSO myeloma cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **80**: 719—730.
- LI D., 1995. Development and survival of *Erigonidium graminicolum* Sundevall (Araneae: Linyphiidae-Erigoninae) at constant temperatures. *Bull. Entomol. Res.*, **86**: 78—91.
- LI D., JACKSON R.R., 1996. How temperature affects development and reproduction in spiders: a review. *J. Thermal Biol.*, **21**: 245—274.
- LI D., 2002. The combined effects of temperature and diet on development and survival of a crab spider, *Misumenops tricuspidatus* (Fabricius) (Araneae: Thomisidae). *J. Thermal Biol.*, **27**: 83—93.
- LI D., LIU X., GUO Y., MA E., 2005. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium — treated *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **20**: 412—416.
- LIN K.M., LIN B., LIAN I.Y., MESTRIL R., SCHEFFLER I.E., DILLMANN W.H., 2001. Combined and individual mitochondrial *HSP60* and *HSP10* expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*, **103**: 1787—1792.
- LINDQUIST S., 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 1151—1191.
- LINDQUIST S., CRAIG E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, **55**: 631—677.
- LIPOVŠEK S., NOVAK T., JANŽEKOVIČ F., SENČIČ L., PABST M.A., 2004. A contribution to the functional morphology of the midgut gland in phalangiid harvestmen *Gyas annulatus* and *Gyas titanus* during their life cycle. *Tissue & Cell*, **36**: 275—282.
- LIVINGSTONE D.R., LIPS F., GARCIA MARTINEZ P., PIPE R.K., 1993. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **112**: 265—276.
- LOCKSHIN R.A., ZAKERI Z., 2002. Caspase-independent cell deaths. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**: 727—733.
- LUDWIG M., ALBERTI G., 1988 a. Mineral congregations 'spherites' in the midgut gland of *Coelotes terrestris* (Araneae): structure, composition and function. *Protoplasma*, **143**: 43—50.
- LUDWIG M., ALBERTI G., 1988 b. Digestion in spiders. Histology and the fine structure of the midgut gland of *Coelotes terrestris* (Agelenidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **20**: 709—718.
- LUDWIG M., ALBERTI G., 1992. Ultrastructure and function of the midgut gland of camel-spiders (Arachnida: Solifugae). *Zool. Anz.*, **228**: 1—11.
- ŁUCZAK J., 1984. Spiders of industrial areas. *Pol. Ecol. Stud.*, **10**: 157—185.
- ŁUCZAK J., 1987 a. Spiders of wood and woodlots in an industrial landscape. *Pol. Ecol. Stud.*, **13**: 113—137.
- ŁUCZAK J., 1987 b. Różnego typu zmiany zespołów pajaków w środowisku poddanym presji przemysłowej. Ostrava: Zpravodaj Ochrany Přírody Mesta Ostravy, Český Skaz Ochranu Přírody, pp. 60—70.
- MA X.L., KUMAR S., GAO F., LODEN C.S., LOPEZ B.L., CHRISTOPHER T.A., WANG C., LEE J.C., FEUERSTEIN G.Z., YUE T.L., 1999. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, **99**: 1685—1691.
- MACHO A., HIRSCH T., MARZO I., MARCHETTI P., DALLAPORTA B., SUSIN S.A., ZAMZAMI N., KROEMER G., 1997. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.*, **158**: 4612—4619.

- MAELFAIT J.P., 1996. Soil spiders and bioindication. W: Bioindicator systems for soil pollution. Eds. VAN STRAALEN N.M., KRIVOLUTSKY D.A. Dordrecht: Kluwer Academic Press, pp. 165—178.
- MAHROOF R., KUN YAN Z., SUBRAMANYAM B., 2003. Changes in expression of heat shock proteins in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in relation to developmental stage, exposure time, and temperature. Ann. Entomol. Soc. Am., **98**: 100—107.
- MAJKUS Z., 1988. Ekologicko-faunistická charakteristika arachnocenóz vybraných ostravských hald. Praha: Státní Pedagogické Nakladatelství.
- MAJKUS Z., 2003. Ekologicko-faunistická charakteristika arachnocenóz haldy Dolu Odry (Lidice). W: Biologie — Ekologie; Změny Životního Prostředí a jejich Bioindikace II. Ed. PLÁŠEK V. Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Ostraviensis, pp. 81—91.
- MARC P., CANARD A., YSNEL F., 1999. Spiders (Araneae) useful for pest limitation and bioindication. Agric. Ecosyst. Environ., **74**: 229—273.
- MARCZYK G., MIGULA P., TRZCIONKA E., 1993. Physiological responses of spiders to environmental pollution in the Silesian Region (Southern Poland). Sci. Total Environ., **2**: 1315—1321.
- MARONI G., WATSON D., 1987. Uptake and binding of cadmium, copper and zinc by *Drosophila melanogaster* larvae. Insect Biochem., **15**: 55—63.
- MARONI G., WISE J., JOUNG J.E., OTTO E., 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. Genetics, **117**: 739—744.
- MARZO I., BRENNER C., KROEMER G., 1998. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. Biomed. Pharmacother., **52**: 248—251.
- MASOUD L., VIJAYASARATHY C., FERNANDEZ-CABEZUDO M., PETROIANU G., SALEH A.M., 2003. Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: a possible mechanisms for toxicity in low dose exposure. Toxicology, **185**: 89—102.
- MASTERS B.A., KELLY E.J., QUAAFE C.J., BRINSTER R.L., PALMITER R.D., 1994. Targeted disruption of metallothionein-I and metallothionein-II genes increases sensitivity to cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 584—588.
- MATSUBARA J., SHIDA T., ISHIOKA K., 1986. Protective effect of zinc against lethality in irradiated mice. J. Environ. Res., **41**: 558—567.
- MATSUBARA J., TAJIMA Y., KARASAWA M., 1987. Metallothionein induction as a potent means of radiation protection in mice. Radiat. Res., **111**: 267—275.
- MCCLELLAN-GREEN P., ROMANO J., OBERDÖRTER E., 2007. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. Environ. Res., **104**: 183—191.
- MEDINA M.L., CHAPMAN B.S., BOLENDER J.P., PLESNAK L.A., 2002. Transient vesicle leakage initiated by a synthetic apoptotic peptide derived from the death domain of neurotrophin receptor, p75NTR. J. Peptide Res., **59**: 149—158.
- MELCHER A., GOUGH M., TODRYK S., VILE R., 1999. Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? J. Mol. Med., **77**: 824—833.
- MENDONCA R.Z., ARROZIO S.J., ANTONIAZZI M.M., FERREIRA J.M.C., PEREIRA C.A., 2002. Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding. J. Biotechnol., **97**: 13—22.
- MIGULA P., DOLEŻYCH B., BIELAN Z., ŁASZCZYCA P., HOWANIEC M., 1990. Stress responses by organisms from industrially polluted regions. W: Środowisko przyrodnicze regionów szczególnego zagrożenia. Ed. GODZIK S. Warszawa: SGGW, **62**: 108—129.
- MIGULA P., GŁOWACKA E., 1996. Heavy metals as stressing factors in the red wood ants (*Formica polyctena*) from industrially polluted areas. Fresenius' J. Analytical Chem., **354**: 653—659.
- MIGULA P., ŁASZCZYCA P., AUGUSTYNIAK M., WILCZEK G., ROZPĘDEM K., KAFEL A., WOŁOSZYN M., 2005. Antioxidative defence enzymes in beetles from a metal pollution gradient. Biologia (Bratislava), **59**: 645—665.
- MISRA H.P., FRIDOVICH J., 1972. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., **247**: 3170—3175.
- MIZUTANI H., TADA-OIKAWA S., IRAKU Y., OIKAWA S., KOJIMA M., KAWANISHI S., 2002. Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., **277**: 30684—30689.
- MOMMSEN T.P., 1977. Digestive enzymes of a spider (*Tegenaria atrica* KOCH) — III. Esterases, Phosphatases, Nucleases. Comp. Biochem. Physiol., **60A**: 377—382.
- MORALES A.E., PEREZ-JIMENEZ A., HIDALGO M.C., ABELLAN E., CARDENETE G., 2004. Oxidative

- stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **139C**: 153—161.
- MORGAN A.J., STÜRZENBAUM S.R., WINTERS C., GRIME G.W., AZIZ N.A.A., 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotox. Environ. Safety*, **57**: 11—19.
- MOTE P.L., TILLMAN J.B., SPINDLER S.R. 1998. Glucose regulation of GRP78 gene expression. *Mech. Ageing Dev.*, **104**: 149—158.
- MOULDER B.C., REICHLE D.E., 1972. Significance of spider predation in the energy dynamics of forest-floor arthropod communities. *Ecol. Monographs*, **42**: 473—498.
- MOURENTE G., DIAZ-SALVAGO E., 1999. Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. *Comp. Biochem. Physiol.*, **124B**: 405—416.
- NABHOLTZ J.V., CROSSLEY D.A., 1978. Ingestion and elimination of cesium-134 by the spider *Pardosa lapidicana*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **71**: 325—328.
- NAKAMURA K., 1987. Hunger and starvation. W: *Ecophysiology of Spiders*. Ed. NENTWIG W. Springer-Verlag, pp. 287—295.
- NAKASHIMA T., SEKIGUCHI T., KURAOKA A., FUKUSHIMA K., SHIBATA Y., KOMIYAMA S., NISHIMOTO T., 1993. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 6367—6374.
- NAZIR A., MUKHOPADHYAY I., SAXENA D.K., KAR CHOWDHURI D., 2001. Chlorpyrifos-induced hsp70 expression and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **41**: 443—449.
- NENTWIG W., 1983. The prey of web-building spiders compared with feeding experiments (Araneae: Araneidae, Linyphiidae, Pholcidae, Agelenidae). *Oecologia, Berlin*, **56**: 132—139.
- NENTWIG W., 1986. Non-webbuilding spiders: prey specialists or generalists? *Oecologia*, **69**: 571—576.
- NENTWIG W. (red.), 1987. *Ecophysiology of spiders*. Berlin: Springer-Verlag.
- NIELSEN S.A., CLAUSEN J., SOREN T., 1997. Detoxification strategies of two types of spiders revealed by cypermethrin application. *ALTA*, **25**: 255—261.
- NOBEL C.S., BURGESS D.H., ZHIVOTOVSKY B., BURKITT M.J., ORRENIUS S., SLATER A.F., 1997. Mechanism of ditiocarbamate inhibition of apoptosis: thiol oxidation by ditiocarbamate disulfides directly inhibits processing of the caspase-3 proenzyme. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**: 636—643.
- NORDBERG M., 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, **46**: 243—254.
- NYFFELER M., SUNDERLAND K.D., 2003. Composition, abundance and pest control potential of spider communities in agroecosystems: a comparison of European and US studies. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **95**: 579—612.
- O'BRIEN M.L., TEW K.D., 1996. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer.*, **32**: 967—978.
- OVERDÖRSTER E., BROUWER M., HOEXUM-BROUWER T., MANNING S., MCLACHLAN J.A., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environ. Health Perspec.*, **108**: 640—646.
- OPPENHEIM R.W., FLAVELL R.A., VINSANT S., PREVETTE D., KUAN C.-Y., RAKIC P., 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.*, **21**: 4752—4760.
- ORMEROD M.G., 1990: Further applications to cell biology. W: *Flow cytometry. A practical approach*. Ed. ORMEROD M.G. Oxford—New York—Tokyo: Oxford University Press, pp. 265—273.
- ORR C.W.M., 1970. The inhibition of catalase (Hydrogen peroxide: Hydrogen peroxide oxidoreductase EC. 1.11.1.6) by ascorbate. W: *Methods in Enzymology*. Eds. COLOWICK S.P., KAPLAN N., McCORMACK D.B., WRIGHT L.D. Vol. 18. New York: Academic Press, pp. 59—62.
- ORRENIUS S., 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol. Lett.*, **149**: 19—23.
- PAPACONSTANTINOU H.T., HWANG K.O., RAJAVAMAN S., HELLMICH M.R., TOWNSEND C.M., IRG, KO T.C., 1998. Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. *Surgery*, **124**: 152—158.
- PARCELLIER A., GURBUXANI S., SCHMITT E., SOLARY E., GARRIDO C., 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Bochem. Biophys. Res. Comm.*, **304**: 505—512.
- PARDINI R.S., 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active prooxidants. *Arch. Insects. Biochem. Physiol.*, **29**: 101—118.

- PARK J., LIU Y., KLAASSEN C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*, **163**: 93—100.
- PARONE P.A., JAMES D., MARTINOU J.C., 2002. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, **84**: 105—111.
- PASCUAL P., PEDRAJAS J.R., TORIBIO F., LOPEZ-BAREA J., PEINADO J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem. Biochem. Interact.*, **145**: 191—199.
- PAWERT M., TRIEBSKORN R., GRÄFF S., BERKUS M., SCHULZ J., KÖHLER H.-R., 1996. Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *Sci. Tot. Environ.*, **181**: 187—200.
- PEDERSEN L.-F., DALL L.G., SORENS B.C., MAYNTZ D., TOFT S., 2002. Effects of hunger level and nutrient balance on survival and acetylcholinesterase activity of dimethoate exposed wolf spiders. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **103**: 197—204.
- PEDERSEN S.N., PEDERSEN K.L., HOJRUP P., KNUDSEN J., DEPLEDGE M.H., 1998. Induction and identification of cadmium-, zinc-, and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L). *Comp. Biochem. Physiol.*, **120C**: 251—259.
- PENA-LLOPIS S., PENÀ J.B., SANCHO E., FERNANDEZ-VEGA C., FERRANDO M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere*, **45**: 671—681.
- PIECHOTTA G., LACORN M., LANG T., KAMMANN U., SIMAT T., JENKE H.-S., STEINHART H., 1999. Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotox. Environ. Safety*, **42**: 50—56.
- PLUMIER J.C., ROSS B.M., CURRIE R.W., ANGELIDIS C.E., KAZLARIS H., KOLLIAS G., PAGOULATOS G.N., 1995. Transgenic mice expressing heat shock protein 70 have improved postischemic myocardial recovery. *J. Clin. Invest.*, **95**: 1854—1860.
- POLLA B.S., KANTENGWA S., FRANCOIS D., 1996. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shocks against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 6458—6463.
- PORTER A.G., JANICKE R.U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death. Diff.*, **6**: 99—104.
- PROSKURYAKOV S.Y., KONOPLYANNIKOV A.G., GABLI V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.*, **283**: 1—16.
- PRUSKI A.M., DIXON D.R., 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.*, **57**: 127—137.
- PULIDO M.D., PARRISH A.R., 2003. Metal-induced apoptosis. *Mechanisms. Mutat. Res.*, **533**: 227—241.
- PULZ R., 1987. Thermal and water relations. W: *Ecophysiology of spiders*. Ed. NENTWIG W. Berlin: Springer-Verlag, pp. 26—55.
- PUNDA H., 1975. Pająki borów sosnowych. Klucze do oznaczania bezkręgowców Polski. T. 1. Warszawa: PAN, Instytut Zoologii. PWN.
- QIN W., TYSHENKO M.G., WU B.S., WALKER V.K., ROBERTSON R.M., 2003. Cloning and characterization of a member of hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. *Cell Stress Chaperones*, **8**: 144—152.
- RABITSCH W.B., 1995. Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnold stein, Austria III. *Arach. Environ. Pollut.*, **2**: 249—257.
- RADFORD N.B., FINA M., BENJAMIN I.J., 1996. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2339—2342.
- RAFFRAY M., COHEN G.M., 1997. Apoptosis and necrosis in toxicology. A continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol. Ther.*, **75**: 153—177.
- RAO J.V., 2006. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **143C**: 492—498.
- RAYNAL P., POLLARD H.B., 1994. The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, **1197**: 63—93.
- REERS M., SMITH T.W., CHEN L.B., 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, **30**: 4480—4486.
- REINECKE A.J., REINECKE S.A., 2003. The influence of exposure history to lead on the lysosomal response in *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotox. Environ. Safety*, **55**: 30—37.
- RICHTER C., SCHWEIZER M., COSSARIZZA A., FRANCESCHI C., 1996. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.*, **378**: 107—110.
- ROBILLARD S., BEAUCHAMP G., LAULIER M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the fresh water mussel *Anodonta*

- donta cygnea* at three different exposure sites. *Comp. Biochem. Physiol.*, **135C**: 49—59.
- RODRIGUEZ A., OLIVER H., ZOU H., CHEN P., WANG X., ABRAMS J.M., 1999. Dark, is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/Ced-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *Nature Cell Biol.*, **1**: 272—279.
- RODRIGUEZ E.M., MEDESANI D.A., FINGERMAN M., 2007. Endocrine disruption in crustacean due to pollutants: a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, **146A**: 661—671.
- RODRIGUEZ-ARIZA A., PEINADO J., PUEYO C., LÓPEZ-BAREA J., 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **50**: 2568—2573.
- RODRIGUEZ-ARIZA A., RODRIGUEZ-ORTEGA M.J., MARENCO J.L., AMEZCUA O., ALHAMA J., LOPEZ-BAREA J., 2003. Uptake and clearance of PCB congeners in *Chamaelea gallina*: response of oxidative stress biomarkers. *Comp. Biochem. Physiol.*, **134C**: 57—67.
- ROMER F., GNATZY W., 1981. Arachnid oenocytes. Ecdysone synthesis in the legs of harvestmen (Opilionidae). *Cell Tissue Res.*, **216**: 449—453.
- ROTTENBERG H., WU S., 1998. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **1404**: 393—404.
- ROWE C.L., KINNEY O.M., NAGLE R.D., CONGDON J.D., 1998. Elevated maintenance costs in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to a mixture of trace elements during the embryonic and early larval periods. *Physiol. Zool.*, **71**: 27—35.
- ROWE C.L., HOPKINS W.A., ZEHNDER C., CONGDON J.D., 2001. Metabolic costs incurred by crayfish (*Procambarus acutus*) in a trace element-polluted habitat: further evidence of similar responses among diverse taxonomic groups. *Comp. Biochem. Physiol.*, **129C**: 275—283.
- RUDOLF E., CERVINKA M., 2006. The role of intracellular zinc in chromium (VI)-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis. *Chem. Biol. Interact.*, **162**: 212—227.
- SALEH A.M., VIJAYASARATHY C., MASOUD L., KUMAR L., SHAHIN A., KAMBAL A., 2003. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**: 47—57.
- SALVIOLI S., ARDIZZONI A., FRANCESCHI C., COSSARIZZA A., 1997. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.*, **411**: 77—82.
- SAMALI A., COTTER T.G., 1996. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell Res.*, **223**: 163—170.
- SAMALI A., ORRENIUS S., 1998. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress & Chaperones*, **3**: 228—236.
- SAMALI A., NORDGREN H., ZHIVOTOVSKY B., PETERSON E., ORRENIUS S., 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**: 6—11.
- SANDERS B.M., HOPE C., PASCOE V.M., MARTIN L.S., 1991. Characterization of the stress protein response in two species of *Collisella* limpets with different temperature tolerances. *Physiol. Zool.*, **64**: 1471—1489.
- SANDERS B.M., MARTIN L.S., NAKAGAWA P.A., HUNTER D.A., MILLER S., ULLRICH S.J., 1994. Specific cross-reactivity of antibodies raised against two major stress proteins, stress 70 and chaperonin 60 in diverse species. *Environ. Toxicol. Chem.*, **13**: 1241—1249.
- SANE A.T., BERTRAND R., 1999. Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G1 arrest followed by necrotic cell death. *Cancer. Res.*, **59**: 3565—3569.
- SANZ A., HIONA A., KUJOTH G.C., SEO A.Y., HOFER T., KOUVENHOVEN E., KALANI R., PROLLA T.A., BARJA G., LEEUWENBURGH C., 2007. Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice. *Exp. Gerontol.*, **42**: 173—182.
- SATO M., BREMNER I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.*, **14**: 325—337.
- SATO N., IWATA S., NAKAMURA K., HORI T., MORI K., PODOI J., 1995. Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J. Immunol.*, **154**: 3194—3203.
- SCHILL R.O., KÖHLER H.-R., 2004 a. Does the environment or the source of the population define stress status and energy supply in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum*? *Ecotoxicology*, **13**: 683—695.
- SCHILL R.O., KÖHLER H.-R., 2004 b. Energy reserves and metal-storage granules in the hepatopancreas of *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber* (Isopoda) from a metal gradient at Avonmouth, UK. *Ecotoxicology*, **13**: 787—796.

- SCHMALHOFER V.R., 1999. Thermal tolerances and preferences of the crab spiders *Misumenops asperatus* and *Misumenoides formosipes* (Araneae, Thomisidae). *J. Arachnol.*, **27**: 470—480.
- SESHAGIRI S., MILLER L.K., 1997. *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr. Biol.*, **7**: 455—460.
- SHARMA R., AWASTHI S.A.K.H., SINGH S.V., PIPER J.T., AWASTHI Y.C., 1997. Differential carcinogenicity of benzo[a]pyrene in male and female cd-1 mouse lung. *J. Toxicol. Environ. Health*, **52**: 45—62.
- SHIM J.-K., JUNG D.-Q., PARK J.-W., KIM D.-W., HA G.-M., LEE K.-Y., 2006. Molecular cloning of the heat-shock cognate 70 (*Hsc70*) gene from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its expression in response to heat shock and starvation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **145C**: 288—295.
- SHIMIZU M., HOCHADEL J.F., WAALKES M.P., 1997. Effects of glutathione depletion on cadmium induced metallothionein synthesis, cytotoxicity, and proto-oncogene expression in cultured rat myoblasts. *J. Toxicol. Environ. Health*, **51**: 609—621.
- SIBLY R.M., CALLOW P., 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biol. J. Linn. Society*, **37**: 101—116.
- SIES H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 916—21.
- SIMMONS T.W., JAMALL L.S., LOCOSHIN R.A., 1989. Selenium independent glutathione peroxidase activity associated with glutathione S-transferase from the housefly, *Musca domestica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**: 323—327.
- SIMON L., KARIM N.M., 2001. Control of starvation induced apoptosis in Chinese hamster ovary cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **78**: 645—657.
- SIMPKINS C., BALDERMAN S., MENSAH E., 1998. Mitochondrial oxygen consumption is synergistically inhibited by metallothionein and calcium. *J. Surg. Res.*, **80**: 16—21.
- SINGH N.P., 2000. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.*, **256**: 328—337.
- SMITH K., 1991. Dietary modulation of the glutathione detoxification pathway and the potential for altered xenobiotic metabolism. W: Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing. Ed. FRIEDMAN. New York: Plenum Press, pp. 165—169.
- SMITH T.R., TREMBLAY G.C., BRADLEY T.M., 1999. Characterization of the heat shock protein response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, **20**: 279—292.
- SNYDER M.J., CHANG E.S., 1991. Ecdysteroids in relation to the molt cycle of the American lobster, *Homarus americanus*. Hemolymph titers and metabolites. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **85**: 286—296.
- SNYDER M.J., 1998. Identification of a new cytochrome P450 family, CYP45, from the lobster *Homarus americanus* and expression following hormone and xenobiotic treatments. *Arch. Biochem. Biophys.*, **358**: 271—276.
- SNYDER M.J., MULDER E.P., 2001. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquat. Toxicol.*, **55**: 177—190.
- SPURGEON D.J., SVEDSEN C., RIMMER V.R., HOPKIN S.P., WEEKS J.M., 2000. Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *App. Soil. Ecol.*, **7**: 1800—1809.
- SREEDHAR A.S., PARDHASARADHI B.V., KHAR A., SRINIVAS U.K., 2002. A cross talk between cellular signalling and cellular redox state during heat-induced apoptosis in a rat histiocytooma. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**: 221—227.
- SREEDHAR A.S., CSERMELY P., 2004. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, **101**: 227—257.
- SRIVASTAVA P., 2002. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**: 395—425.
- STARK J.D., JEBSON P.C., THOMAS G., 1995. The effects of pesticides on spiders from the lab to the landscape. *Rev. Pestic. Toxicol.*, **3**: 83—110.
- STENNICKE H.R., SALVESEN G.S., 2000. Caspase assays. *Methods Enzymol.*, **322**: 91—100.
- STONE D., JEPSON P., KRAMARZ P., LASKOWSKI R., 2001. Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. *Environ. Pollut.*, **113**: 239—244.
- STONE D., JEPSON P., LASKOWSKI R., 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, **132C**: 105—112.

- STÜRZENBAUM S.R., KILLE P., MORGAN A.J., 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus* L. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1398**: 294—304.
- SUGIMOTO A., HOZAK R.R., NAKASHIMA T., NISHIMOTO T., ROTHMAN J.H., 1995. DAD1, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *EMBO J.*, **14**: 4434—4441.
- SUN C., JIANG S., ZHENG L.M., OJCIUS D.M., YOUNG J.D., 1994. Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation. *J. Exp. Med.*, **179**: 559—568.
- SUZUKI K.T., SOMYEA A., KOMADA Y., OGURA Y., 2002. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to C-deficient diets in mice. *J. Inorg. Biochem.*, **88**: 173—182.
- SWEET L.I., PASSINOREADER D.R., MEIER P.G., OMNAN G.M., 1999. Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. *Biomarkers*, **4**: 237—253.
- TADA-OIKAWA S., HIRAKU Y., KAWANISHI M., KAWANISHI S., 2003. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci.*, **73**: 3277—3288.
- TAN S., SAGARA Y., LIU Y., MAHER P., SCHUBERT D., 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.*, **141**: 1423—1432.
- TANAKA K., ITO Y., 1982. Decrease in respiratory rate in a wolf spider, *Pardosa astrigera* (L. KOCH), under starvation. *Res. Popul. Ecol.*, **24**: 360—374.
- TARWID M., 1987. Fecundity of the spider *Enoplognatha ovata* Cl. in industrial and forest-agricultural regions. *Pol. Ecol. Stud.*, **10**: 47—60.
- TERASHIMA J., BOWNES M., 2004. Translating available food into the number of eggs laid by *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **167**: 1711—1719.
- THORNALLEY P., VASAK M., 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation induced oxidative stress. Kinetics and mechanisms of its reactions with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.*, **827**: 36—44.
- TIANO L., FEDELI D., BALLARINI P., SANTONI G., FALCIONI G., 2001. Mitochondrial membrane potential in density-separated trout erythrocytes exposed to oxidative stress *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**: 226—237.
- TIETZE F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, **27**: 502—522.
- TIMBRELL J.A., 1992. Principles of Biochemical Toxicology. London: Taylor & Francis.
- TIMBRELL J.A., 1998. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, **129**: 1—12.
- TOFT S., JENSEN A.P., 1998. No negative sublethal effects of two insecticides on prey capture and development of a spider. *Pestic. Sci.*, **52**: 223—228.
- TRABALON M., BAUTZ A.M., MORINIERE M., PORCHERON P., 1992. Ovarian development and correlated changes in hemolymphatic ecdysteroid levels in two spiders, *Coelotes terrestris* and *Tegenaria domestica* (Araneae, Agelenidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **88**: 128—136.
- TRABALON M., NIGORET J., LEGRAND-FROSSI C., 2005. Effect of 20-hydroxyecdysone on cannibalism, sexual behavior, and contact sex pheromone in the solitary female spider, *Tegenaria atrica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **144**: 60—66.
- TSANGARIS G.T., TZORTZATOU-STATHOPOULOU F., 1998. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology*, **128**: 143—150.
- UETZ G.W., BISCHOFF J., RAVER J., 1992. Survivorship of wolf spider (Lycosidae) reared on different diets. *J. Arachnol.*, **20**: 207—211.
- VAN BLADEREN P.J., 2000. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.*, **129**: 61—76.
- VAN DEN DOBBELSTEEN D.J., NOBEL C.S.I., SCHLEGEL J., COTGREAVE I.A., ORRENIUS S., SLATER A.F.G., 1996. Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15420—15427.
- VAN ERP S., BOOTH L., GOONERATNE R., O'HALLORAN K., 2002. Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Environ. Toxicol.*, **17**: 449—456.
- VAN HAMBURG H., GUEST P.J., 1997. The impact of insecticides on beneficial arthropods in cotton agro-ecosystems in South Africa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **32**: 63—68.
- VAN STRAALEN N.M., 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, **1**: 325—330.
- VAROL I., OZASLAN M., OZDEMIR A., AKAN Z., KUTBAY F., 2006. Two species of genus *Xerolyco-*

- sa* (Araneae: Lycosiade) new to the turkish spider fauna. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, **1**: 69—73.
- VASAK M., HASLER D.W., 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**: 177—183.
- VAUX D.L., 2002. Apoptosis and toxicology-what relevance? *Toxicology*, **181—182**: 3—7.
- VAYSSIER M., POLLA B.S., 1998. Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell Stress Chaperones*, **3**: 221—227.
- VEGA-LOPEZ A., GALAR-MARTINEZ M., JIMENEZ-OROZCO F.A., GARCIA-LATORRE E., 2007. Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **146**: 672—678.
- VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H., REUTELINGSPERGER C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.*, **184**: 39—51.
- VIARENGO A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci.*, **1**: 295—317.
- VIARENGO A., BETTELLA E., FABBRI R., BURLANDO B., LAFAURIE M., 1997. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. *Marine Environ. Res.*, **4**: 1—11.
- VIDEIRA R.A., ANTUNES-MADEIRA M., MADEIRA V.M.C., 2001. Ethylaziraphos interaction with membrane lipid organization induces increase of proton permeability and impairment of mitochondrial bioenergetic functions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **175**: 209—216.
- VINA J., BORRAS C., GAMBINI J., SASTRE J., PALLARDO V.V., 2005. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by estrogenic compounds. *FEBS Lett.*, **579**: 2541—2545.
- WALKER C.H., HOPKIN S.P., SIBLY R.M., PEAKALL D.B., 2002. *Podstawy ekotoksykologii*. Warszawa: PWN.
- WANG Z., MALONE M.H., HE H., MCCOLL K.S., DISTELHORST C.W., 2003. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278**: 23861—23867.
- WELCH W.J., 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.*, **72**: 1063—1081.
- WHO, 1989. Dimethoate: Environmental Health Criteria. World Health Organization, Geneva. www.Inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc90.htm
- WICKNER S., MAURIZI M., GOTTESMAN S., 1999. Post-translational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science*, **286**: 1888—1893.
- WILCZEK G., 1996. Adenine nucleotides and adenylate energy charge as measures of physiological condition of spiders exposed to environmental stress. *Studia Societatis Scientiarum Torunensis. Toruń — Polonia. S. G. Physiologia*, **4**, **3**: 137—142.
- WILCZEK G., MIGULA P., 1996. Metal body burdens and detoxifying enzymes in spiders from industrially polluted areas. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**: 643—647.
- WILCZEK G., MAJKUS Z., MIGULA P., BEDNARSKA K., ŚWIERCZEK E., 1997. Heavy metals and detoxifying enzymes in spiders from coal and metallurgic dumps near Ostrava (Czech Republic). W: *Proceedings 16th European Colloquium of Arachnology*, Siedlce, Poland, July 1996. Ed. ŻABKA M., pp. 317—328.
- WILCZEK G., BABCZYŃSKA A., 2000. Heavy metals in the gonads and hepatopancreas of spiders (Araneae) from variously polluted areas. *Ekologia (Bratislava)*, **19**: 283—292.
- WILCZEK G., BABCZYŃSKA A., MIGULA P., WENCELIS B., 2003. Activity of esterases as biomarkers of metal exposure in spiders from the metal pollution gradient. *Pol. J. Environ. Stud.*, **6**: 765—771.
- WILCZEK G., BABCZYŃSKA A., AUGUSTYNIAK M., MIGULA P., 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environ. Pollut.*, **132**: 453—461.
- WILCZEK G., 2005. Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders from industrially polluted areas exposed to high temperature and dimethoate. *Comp. Biochem. Physiol.*, **141C**: 194—206.
- WILCZEK G., BABCZYŃSKA A., MAJKUS Z., 2005. Body burdens of metals in spiders from Lidice coal dump near Ostrava (Czech Republic). *Biologia (Bratislava)*, **60**: 599—605.
- WILCZEK G., BABCZYŃSKA A., WILCZEK P., DOLEŻYCH B., MIGULA P., MŁYŃSKA H., 2007. Cellular stress re-

- actions in female and male spiders from areas variously polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **70**: 127—137.
- WILCZEK P., SZYDŁOWSKA I., ŁOTYSZ D., RELIGA Z., 1996. The use of flow cytometry for the investigation of viability of heart valve-derived fibroblasts. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **34**: 41—42.
- WINZER K., WINSTON G.W., BECKER W., VAN NOORDEN C.J.F., KOHLER A., 2001. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.*, **52**: 143—155.
- WISE D.H., 1993. Spiders in Ecological Webs. Cambridge studies of Ecology. Cambridge.
- YU S.J., 1982. Host plant induction of glutathione S-transferase isozymes in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **18**: 101—106.
- YUAN C., KADIISKA M., ACHANZAR W.E., MASON R.P., WAALKES M.P., 2000. Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **164**: 321—329.
- YURKOW E.J., MAKHJANI P.R., 1998. Flow cytometric determination of metallothionein levels in human peripheral blood lymphocytes: utility in environmental exposure assessment. *J. Toxicol. Environ. Health*, **54**: 445—457.
- YURKOW E.J., DECOSTE C.J., 1999. Effects of cadmium on metallothionein levels in human peripheral blood leukocytes: a comparison with zinc. *J. Toxicol. Environ. Health*, **58**: 313—327.
- ZAKERI Z., LOCKSHIN R.A., 2002. Cell death during development. *J. Immunol. Methods*, **265**: 3—20.
- ZAMZAMI N., MARCHETTI P., CASTEDO M., ZANIN C., VAYSSIÈRE J.L., PETIT P.X., KROEMER G., 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **181**: 1661—1672.
- ZANGER M., ALBERTI G., KUHN M., KÖHLER H.-R., 1996. The stress-70 (hsp70) protein family in diplopods: induction and characterization. *J. Comp. Physiol.*, **165**: 622—627.
- ZANGER M., KÖHLER H.-R., 1996. Colour change: novel biomarker indicating sublethal stress conditions in Diplopoda. *Biomarkers*, **1**: 99—106.
- ZHANG J.F., LIU SUN Y.Y., WANG X.R., WU J.C., XUE Y.Q., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **19**: 185—190.
- ZHAO J.Z., 1984. Analysis of species, distribution and population dynamics of spiders in China cotton. *Nat. Enem. Insects*, **6**: 1—12.
- ZHAO J.Z., 1988. Effects of food and temperature on development of *Enoplognatha japonica* (Araneae: Theridiidae). *Ch. J. Zool.*, **23**: 5—7.
- ZIMAKOWSKA-GNOIŃSKA D., 1981. The effect of industrial pollution on bioenergetic indices and on chemical composition of polyphagous predators — Araneae. *Pol. Ecol. Stud.*, **7**: 61—76.
- ZIMAKOWSKA-GNOIŃSKA D., TARWID M., 1984. The effect of industrial environment on survival, respiratory metabolism and energetic value of females of *Enoplognatha ovata* Cl (Araneae). *Pol. Ecol. Stud.*, **10**: 35—45.

Składam serdeczne podziękowania za życzliwość, cenne dyskusje i uwagi:

prof. dr. hab. Pawłowi Miguli,
kierownikowi Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Uniwersytetu Śląskiego,

prof. dr. hab. Jerzemu Kłagowi,
kierownikowi Katedry Histologii Uniwersytetu Śląskiego,

dr. hab. n. med. Romualdowi Wojniczowi,
kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Śląskiej Akademii Medycznej,

dr. hab. Bogdanowi Doleżychowi
z Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Uniwersytetu Śląskiego,

dr. hab. Mirosławowi Nakoniecznemu
z Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Uniwersytetu Śląskiego,

dr. n. med. Piotrowi Wilczkowi
z Pracowni Bioinżynierii — Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze,

dr Paulinie Kramarz
z Zakładu Ekotoksykologii, Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego,

dr Agnieszce Babczyńskiej
z Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Uniwersytetu Śląskiego,

RNDr Zdenkowi Majkusowi
z Prirodovedeckiej Fakulty Uniwersytetu w Ostrawie, Republika Czeska.

Słowa podziękowania kieruję do Koleżanek i Kolegów z Katedry Fizjologii Zwierząt
i Ekotoksykologii za wsparcie i pomoc.

Strategies of cellular reaction towards environmental stress in spiders

S u m m a r y

The aim of the work was to compare cellular effects of natural (heat shock and starvation) and anthropogenic (organophosphorous pesticide) stressors in two, behaviorally different spider species: web building *Agelena labyrinthica* and wandering *Xerolycosa nemoralis*, from areas variously polluted by heavy metals. It was crucial to check whether the response of female and male spiders, chronically exposed to high metal concentrations in their habitats to additional stressors, is similar as in spiders from the slightly polluted site and decide which of the stressogenic factors exerts the strongest additional costs for an organism. Since they are the midgut glands that play a strategic role in digestion and detoxification, the analyses were conducted in this organ. Using cytometric techniques and spectrophotometric methods, the following parameters were measured:

- the intensity of apoptotic and necrotic changes as well as the quantity of cells with depolarized mitochondria and the caspase-like protease activity level;
- the quantitative changes in the cells that positively react with metallothionein (Mt) and heat shock protein (Hsp70) antibodies;
- the level of selected antioxidative parameters (total glutathione concentration, activity of seleno-dependent glutathione peroxidase; GPOX, seleno-independent glutathione peroxidase; GSTPx, glutathione *S*-transferase; GST, superoxide dismutase; SOD, catalase; CAT).

Obtained results demonstrated that the individuals from heavily polluted areas were more sensitive to applied stressing factors than the animals that have not been exposed to environmental pollutants. The diversity in the cellular response of female and male spiders from variously polluted habitats confirms the

necessity of considering the aspect of gender in this kind of comparisons. Mixing males and females together may conceal quantitative correlations between analysed parameters, when coping with long lasting pre-exposure.

From among all stressing factors applied, the most pronounced changes, measured as the percentage of apoptotic cells in spider midgut glands, were caused by hunger. Pro-apoptotic effect of the exposure to the applied factors diminished according to the following order: hunger > heat shock + dimethoate > dimethoate > heat shock. Female *X. nemoralis* seemed more resistant to starvation, since the stressing factor did not enhance necrotic changes in the cells of their midgut glands. In heat shock and/or dimethoate exposed groups the degree of necrotic changes in the organ was higher than in respective *A. labyrinthica* groups. This may indicate higher sensitivity of the wandering spider species to the remaining stressing factors.

Enzymatic neutralization of reactive oxygen species in female *X. nemoralis* was revealed mainly by the increased activity of SOD and CAT. In spiders also glutathione concentration and activity of glutathione-dependent enzymes were elevated in response to stressing factors. Antioxidative responses registered in *A. labyrinthica* midgut glands were poorly differentiated and appeared mainly as increased glutathione concentration and gender-related GPOX (females and males) or GSTPx (males) activity.

The exposure to stressing factors resulted also in the induction of stress proteins in the spiders. Female *X. nemoralis* had an increased Mt synthesis while males, under the same conditions, had higher Hsp70 production. In case of female *A. labyrinthica* stressing factors stimulated the Hsp70 synthesis, while in males both Hsp70 and Mt production was enhanced.

In case of wolf spiders (*X. nemoralis*) the cytoprotective role of SOD and CAT may be verified by positive correlations found for their activity and necrosis and/or apoptosis intensity in the organ. In case of tunnel spiders (*A. labyrinthica*) both parameters were either negatively correlated or there were no correlations at all. Cytoprotective role in *A. labyrinthica* is likely played by Hsp70, since the percentage of cells dying according to necrotic pathway was lower in those groups where higher percentage of Hsp70 positive cells was found.

Analysed indices of cell death in case of both spider species are good biomarkers of general stress, caused by the exposure to both natural and anthropogenic factors. However, the lack of unequivocal correlations between the level of measured parameters and the kind of stressor is the reason why it

is impossible to point out precisely the cause of the changes, but only to confirm the stress itself that, dependently on its intensity, increased apoptotic and/or necrotic changes. The analyses of quantitative ratios may be used in the comparisons of sensitivity of the species to applied stressing factors.

Obtained results confirmed inter-species differences in antioxidative strategies found in previous investigations on spiders. Irrespectively of the type of stressor, in case of *X. nemoralis* an important defensive role in midgut glands is played by SOD and CAT while in case of *A. labyrinthica* — glutathione and Hsp70. Quantitative changes in the Mt-positive cells in particular experimental groups may indicate that in case of spiders the proteins contribute rather to antioxidative defense than in direct metal binding.

Zellstrategien bei der Reaktion auf Umweltstress bei Spinnen

Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war der Vergleich der Effekte der Einwirkung von natürlichen (thermischer Schock, Hunger) und antropogenen (phosphororganische Pestizide) Stressoren auf die Zellen zweier sich im Verhalten unterscheidenden Spinnenarten, der netzbauenden *Agelena labyrinthica* (Agelenidae) und der Jagdspinne *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae), die aus im unterschiedlichen Grade mit Schwermetallen belasteten Gebieten stammen. Wesentlich war ebenfalls die Prüfung, ob Spinnenweibchen und Männchen, die in ihrer natürlichen Umgebung chronisch hohen Schwermetallbelastungen ausgesetzt sind, im Vergleich zu Exemplaren die aus schwach belasteten Gebieten stammen, in ähnlichem Maße auf zusätzliche Stressoren reagieren, und welche der stressogenen Faktoren die größte zusätzliche Belastung für den Organismus darstellt. Unter Berücksichtigung der strategischen Rolle der Mitteldarmdrüsen bei den Verdauungs- und Detoxifikationsprozessen, wurde die Analyse der Zellparameter auf dieses Organ beschränkt. Unter Zuhilfenahme von zytometrischen Techniken und spektrophotometrischen Methoden wurden für beide Spinnenarten die folgenden vergleichenden Untersuchungen durchgeführt:

- Intensitätsgrad der apoptotischen und nekrotischen Änderungen sowie der quantitativen Veränderungen von Zellen mit depolarisierten Mitochondrien sowie des Aktivitätsniveaus der Caspase ähnlichen Protease;
- Quantitative Änderung der positiv mit Antikörpern auf die Stressproteine Hsp70 und Metallotionein (Mt) reagierenden Zellen;
- Niveau ausgewählter antioxidativer Parameter (Glutathion Gesamtkonzentration sowie Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidase; GPOX, der selenunabhängigen Glutathionperoxi-

dase; GSTPx, Glutathion-S-Transferase; GST, Superoxid-Dismutase; SOD, Katalase; CAT).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen die Behauptung zu, dass Exemplare aus stark belasteten Gebieten empfindlicher auf die Stressfaktoren reagieren, als diejenigen, die zuvor keiner Belastung ausgesetzt waren. Die Verschiedenartigkeit der Zellreaktionen von aus unterschiedlich belasteten Gebieten stammenden Spinnenmännchen und Weibchen bestätigen die Notwendigkeit bei dieser Art von Untersuchungen den Geschlechtsfaktor zu berücksichtigen. Eine gemeinsame Behandlung aller Exemplare kann dazu führen, dass die quantitativen Zusammenhänge zwischen den analysierten Parametern, unter dem Aspekt einer lang anhaltenden Einwirkung der Belastungen auf die Spinnen, nicht zu Tage treten.

Unter den eingesetzten Stressoren hat Hunger bei beiden Arten die größten, auf Grundlage des prozentualen Anteils von apoptotischen Zellen in den Drüsen des Mitteldarms der Spinnen bewerteten Änderungen hervorgerufen. Der proapoptotische Effekt der Einwirkung der eingesetzten Stressfaktoren hat sich in folgender Reihenfolge verringert: Hunger > thermischer Schock + Dimethoat > Dimethoat > thermischer Schock. Es hat sich gezeigt, dass *X. nemoralis* Weibchen widerstandsfähiger gegen Hunger sind, da dieser Stressor die nekrotischen Veränderungen in den Zellen ihrer Drüsen im Mitteldarm nicht verstärkt hat. In den Gruppen, die einem thermischen Schock und/oder Dimethoat ausgesetzt waren, war der Grad der nekrotischen Veränderungen in dem bei dieser Art untersuchten Organ größer als in den analogen *A. labyrinthica* Gruppen. Dies suggeriert eine größere Empfindlichkeit der jagenden Arten gegenüber den übrigen Stressfaktoren.

Die die reaktiven Sauerstoffformen neutralisierenden enzymatischen Reaktionen haben im Falle der

X. nemoralis Weibchen hauptsächlich die SOD und CAT Aktivität verstärkt. In Reaktion auf die Stressfaktoren ist bei den Männchen ebenfalls die Konzentration des Glutathions sowie die Aktivität der mit seinem Metabolismus in Zusammenhang stehenden Enzyme gestiegen. Die in den Mitteldarmdrüsen von *A. labyrinthica* registrierten antioxidantischen Reaktionen unterschieden sich nur schwach und betrafen hauptsächlich den Anstieg der Glutathion Konzentration und in Abhängigkeit vom Geschlecht die GPOX Aktivität (Männchen und Weibchen) oder GSTPx Aktivität (Männchen). Die Reaktion auf die Stressfaktoren bei den Spinnen bestand in der Induktion von Stressproteinen. Die *X. nemoralis* Weibchen zeichnen sich durch eine erhöhte Mt-Synthese aus, wohingegen die Männchen unter ähnlichen Bedingungen die Produktion von Hsp70 erhöht haben. Im Falle von *A. labyrinthica* haben die Stressfaktoren bei den Weibchen die Synthese von Hsp70, bei den Männchen hingegen sowohl von Hsp70 als auch Mt stimuliert.

Im Falle der Jagdspinnen (*X. nemoralis*) können von der zellschützenden Funktion von SOD und CAT die positiven Korrelationen zeugen, die zwischen ihrer Aktivität und dem Intensivierungsgrad der Nekrose und/oder Apoptose in dem analysierten Organ zu verzeichnen waren. Im Falle der Labyrinthspinnen (*A. labyrinthica*) waren beide Parameter negativ korreliert oder fehlten solche Abhängigkeiten völlig. Die zellschützenden Funktionen übernehmen bei *A. labyrinthica* höchstwahrscheinlich Hsp70 Proteine, denn ihr prozentualer Anteil an auf dem Wege von Nekrose sterbenden Zellen war in den Versuchsgruppen niedriger, bei einigen wurde ein höherer

prozentualer Anteil an Hsp70 positiven Zellen verzeichnet.

Die analysierten Indikatoren des Zelltodes stellen im Falle beider Spinnenarten gute Biomarker für den allgemeinen, durch die Einwirkung von sowohl natürlichen als auch antropogenen Faktoren hervorgerufenen allgemeinen Stress dar. Das Fehlen einer eindeutigen Abhängigkeit zwischen den quantitativen Änderungen der gemessenen Parameter und der Art der einwirkenden Stressoren erlauben jedoch keine präzise Differenzierung der Ursachen der eingetretenen Änderungen, sondern bestätigen lediglich die Existenz des Stresses, der in Abhängigkeit des Intensitätsgrades der Stressfaktoren die apoptischen und/oder nekrotischen Prozesse verstärkt hat. Die Analyse der quantitativen Verhältnisse dieser Art von Parameter ermöglichte den Vergleich der Empfindlichkeit der Arten gegenüber den verwendeten Stressfaktoren.

Die erhaltenen Ergebnisse haben die in den vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesene, mit der Art der bei Spinnen in Gang gesetzten antioxidativen Reaktionen in Verbindung stehende Differenzierung der Arten bestätigt. Unabhängig von der Art des einwirkenden Stressfaktors erfüllt im Falle von *X. nemoralis* SOD und CAT eine wichtige Schutzfunktion in den Drüsen des Mitteldarms, wohingegen bei *A. labyrinthica* Glutathion und das Protein Hsp70 diese Funktion übernimmt. Die quantitative Änderung von Mt positiven Zellen in den einzelnen Versuchsgruppen kann darauf hinweisen, dass im Falle von Spinnen das Metallothionein im größeren Maße die Rolle des antioxidativen Schutzes, als die direkte Bindung des Metalls übernimmt.

Redaktor GRAŻYNA WOJDAŁA
Redaktor techniczny BARBARA ARENHÖVEL
Korektor LIDIA SZUMIGAŁA

Copyright © 2008 by
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
Wszelkie prawa zastrzeżone

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-1788-5

Wydawca
Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego
ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice
www.wydawnictwo.us.edu.pl
e-mail: wydawus@us.edu.pl

Wydanie I. Ark. druk. 15,0. Ark. wyd. 12,0.
Przekazano do łamania w lipcu 2008 r.
Podpisano do druku w październiku 2008 r.
Papier offset. kl. III, 90 g Cena 40 zł

Łamanie: Pracownia Składu Komputerowego
Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego
Druk i oprawa: SOWA Sp. z o.o.
ul. Hrubieszowska 6a, 01-209 Warszawa